

**João Madeira de Almeida e Sousa**

Membrana reabsorvível de hidrogel de  
polietileno glicol na regeneração óssea  
guiada: estudo caso controlo em ratos

**Faculdade de Medicina Dentária da**

**Universidade do Porto**

**2012**

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos

*Dissertação de candidatura  
ao Grau de Mestre em Cirurgia Oral  
apresentada à  
Faculdade de Medicina Dentária da  
Universidade do Porto*

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

## **Membros do Conselho Científico da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira (Prof. Catedrático)  
Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso (Prof. Associado com Agregação)  
Prof. Doutor António Cabral Campos Felino (Prof. Catedrático)  
Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva (Prof. Associado com Agregação)  
Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha (Prof. Associado)  
Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz (Prof. Associado)  
Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas (Prof. Auxiliar)  
Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes (Prof. Catedrático)  
Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho (Prof. Associado com Agregação)  
Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho (Prof. Catedrático)  
Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes (Prof. Catedrático)  
Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas (Prof. Associado com Agregação)  
Prof. Doutor José Carlos Reis Campos (Prof. Auxiliar com Agregação)  
Prof. Doutor José Mário Castro Rocha (Prof. Auxiliar)  
Prof. Doute Manuel José Fontes de Carvalho (Prof. Associado)  
Prof. Doutora Maria Cristina Pinto Coelho Mendonça de Figueiredo Pollmann (Prof. Associado)  
Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva (Prof. Associada com Agregação)  
Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes (Prof. Catedrático)  
  
Prof. Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira (Prof. Auxiliar)  
Prof. Doutor Mário Augusto Pires Vaz (Prof. Associado da FEUP - personalidade convidada)  
Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva (Prof. Catedrático)  
Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos (Prof. Associado com Agregação)

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:

estudo caso controlo em ratos

Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo (Prof. Associado com Agregação)

Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria Almeida (Prof. Associado com Agregação)

## **Docentes Jubilados da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira (Prof. Associado)

Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas (Prof. Associado - falecido)

Dr. António Ulisses Matos dos Santos (Assistente Convidado)

Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira (Prof. Associado com Agregação)

Prof. Doutor Francisco António Rebelo Moraes Caldas (Prof. Catedrático)

Dr. José Maria Vaz Osório (Assistente Convidado)

Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Manuel Desport Marques (Prof. Associado Convidado - falecido)

Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo (Prof. Associado)

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

*Aos meus pais*

*A quem tudo devo*

*Pelo amor, incentivo e apoio incondicional, em todas as horas*

*À minha irmã*

*Pela sua amizade e pela força que me transmite apesar da distância...*

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos



## Índice

Agradecimentos.....	11
Palavras-Chave.....	14
Siglas e Abreviaturas.....	15
Resumo.....	16
Abstract.....	18
I - Contexto e Objetivos do Trabalho.....	19
II- Introdução.....	22
1. Regeneração Óssea em Medicina Dentária .....	23
1.1- Introdução histórica .....	23
1.2- Princípios Biológicos da Regeneração Óssea .....	25
1.2.1 - Generalidades .....	25
1.2.2- Matriz óssea .....	28
1.2.3- Cicatrização óssea .....	28
1.3- Definição de Regeneração.....	33
1.3.1 – Regeneração Tecidual Guiada .....	33
1.3.2 – Regeneração Óssea Guiada .....	40
1.4 – Materiais utilizados para regeneração em Medicina Dentária .....	41
1.4.1 - Membranas: materiais e função .....	41
1.4.1.1 – Membranas não reabsorvíveis: materiais e aplicabilidade.....	44
1.4.1.2 – Membranas reabsorvíveis: materiais e aplicabilidade .....	45
1.4.1.2.1 - Membrana de Polietileno Glicol.....	46
1.4.2.2.2 - Propriedades químicas do PEG .....	50
1.4.2.2.3 - Membrana de hidrogel de PEG Straumann® MembraGel.....	51
2- Estudos em modelo animal: ratos Wistar .....	53
2.1 - Definição de defeito crítico .....	54
2.2 - A importância de defeitos ósseos críticos para o estudo de materiais de regeneração óssea.....	54
III - Materiais e métodos .....	56
1. Amostra .....	57
2. Descrição dos procedimentos cirúrgicos.....	57

3. Preparação das amostras para estudo histológico .....	61
4. Análise Histomorfométrica .....	64
5. Análise estatística .....	66
IV - Resultados .....	67
1.1. Análise clínica .....	68
1.2. Análise radiográfica .....	69
1.3. Histologia Descritiva (análise morfológica) .....	70
1.4. Análise da invasão celular .....	75
1.5. Análise histomorfométrica .....	76
1.6. Análise estatística .....	77
V - Discussão .....	85
VI - Conclusões .....	91
Bibliografia .....	94
Índice de Figuras, Tabelas e Gráficos .....	101
Anexos .....	104
Tabelas .....	105

## Agradecimentos

Um trabalho desta natureza não seria possível sem o apoio de uma equipa pluridisciplinar que me acompanhou, em diferentes momentos, durante toda a execução do mesmo:

- Ao Prof. Doutor Ricardo Faria e Almeida, orientador desta tese, pelo incansável apoio em todas as fases deste trabalho, pela presença e disponibilidade permanentes que já o caracteriza e por ser um modelo a seguir;
- Ao Prof. Doutor Mário Vasconcelos, coorientador desta tese, pelo apoio dado em todas as fases laboratoriais deste trabalho, sem as quais não era possível a sua concretização;
- Ao Prof. Doutor António Cabral Campos Felino, pelos ensinamentos transmitidos durante estes dois anos letivos;
- Ao Prof. Doutor João Carvalho por ter tido um papel fundamental ao longo destes dois anos, não só pela experiência transmitida como pela disponibilidade e proximidade com os alunos ao longo da atividade clínica
- A todos os docentes do VI Mestrado de Cirurgia Oral pelos ensinamentos transmitidos durante estes dois anos;
- A todos os meus colegas do VI Mestrado de Cirurgia Oral, em especial à Joana Amaral, minha binómia e amiga, por toda a disponibilidade, paciência e hospitalidade, ao David Alfaiate, pela sua dedicação, ajuda e camaradagem; ao Tiago Escobar, pelo companheirismo no trabalho em

paralelo; ao Francisco Correia, por toda a ajuda e disponibilidade constantes e, à Ana Lemos Costa, pela amizade e principalmente pela força e entusiasmo com que me impulsionou nos últimos meses do desenvolvimento deste trabalho o que foi decisivo na finalização deste projeto;

- À Prof. Doutora Ana Portela, por toda a atenção e tempo que me dispensou desde o primeiro momento e pelo papel fundamental que teve na componente prática, a sua preciosa ajuda laboratorial, essencial ao bom termo deste projeto;
- Ao Prof. Doutor Américo Afonso pela disponibilidade na utilização dos serviços do Laboratório de Anatomia Dentária;
- À técnica D. Ana Mota, pela sua simpatia e grande colaboração;
- À D. Teresa Teles Almeida, pelo apoio na manipulação dos animais de laboratório e a dedicação e zelo pelo bem-estar dos mesmos
- À D. Manuela, D. Alexandra, Sr. Vítor e Sr. Paulo, pela enorme dedicação a todos os alunos;
- A todos os que acompanham na minha vida profissional e pessoal;

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

## Palavras-Chave

Membranas;

Membranas reabsorvíveis;

Hidrogel de polietileno glicol;

PEG;

Regeneração óssea guiada

## **Siglas e Abreviaturas**

RTG – Regeneração tecidual guiada

ROG – Regeneração óssea guiada

PEG – Polietileno glicol

PTFEe – Politetrafluoretileno expandido

HA – Hidroxiapatite

BMP – Proteínas ósseas morfogénicas

IGF – Fatores de crescimento de insulina

FGF – Fatores de crescimento dos fibroblastos

PDGF – Fatores de crescimento de derivados de plaquetas

RGD – Arginina-glicina-ácido aspártico

BMUs – Unidades ósseas multinucleares

## Resumo

A regeneração do osso alveolar perdido é uma necessidade há muito sentida, tendo em vista, quer a regeneração periodontal, quer a colocação de implantes. Para tal, ao longo dos anos ocorreram mudanças na utilização de membranas para a regeneração tecidual guiada (RTG) e, mais tarde, para a regeneração óssea guiada (ROG). Se, inicialmente, o *gold standard* eram as membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido (PTFEe), hoje em dia, é predominante a utilização das membranas reabsorvíveis de colagénio. O fato destas membranas serem pré-fabricadas, havendo necessidade de as adaptar ao sítio cirúrgico (o que constitui muitas vezes uma desvantagem), impulsionou a investigação no sentido de encontrar novas membranas formadas *in situ*. É neste contexto que o hidrogel de polietileno glicol (PEG), material biocompatível e reabsorvível, tem vindo a ser referido nalguns estudos com vista à sua aplicação como membrana, apresentando como principal vantagem o fato de se formar *in situ*, ultrapassando a reconhecida desvantagem de ter de ser feita a sua adaptação ao sítio cirúrgico.

Com o objetivo de testar as capacidades do PEG como barreira celular e verificar histomorfometricamente que o mesmo se torna eficaz na ROG, foi realizado o presente estudo em calotes cranianas em sete ratos Wistar.

Tendo em conta as limitações do estudo, nomeadamente o reduzido tamanho da amostra, o que se refletiu na ausência de peso estatístico, foi possível concluir que a membrana de hidrogel de PEG funciona como barreira celular e permite uma maior regeneração óssea quando comparada com os resultados observados em defeitos em que não foi aplicada membrana.

Novos estudos devem ser prosseguidos, não só numa amostra de maiores dimensões, mas principalmente com ensaios clínicos em humanos, e que permitam comparar o uso deste hidrogel com outro tipo de barreiras.



Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

## Abstract

The regeneration of the alveolar bone that had been lost is a need for a long manifested in view of whether periodontal regeneration or implants placement. To this end, over the years have been witnessing changes in the use of membranes for guided tissue regeneration (GTR) and later for guided bone regeneration (GBR). If initially the gold standard non-resorbable membranes were expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), nowadays, is predominant the use of resorbable collagen membrane. The fact that these membranes are prefabricated with the need to adapt to the surgical site (which is often a disadvantage), spurred research towards finding new membranes formed *in situ*. It is in this context that the hydrogel made of polyethylene glycol (PEG), biocompatible and resorbable, has been mentioned in some studies with a view to their application as membrane presenting as main advantage the fact that form *in situ*, overcoming the disadvantage of recognized adapt to the surgical site.

In order to test the capabilities of PEG as a cellular barrier and check histomorphometrically that it becomes effective in ROG, compared to a membrane without blemish, a study was conducted in calvaria of seven rats. Despite the study's limitations, including the small sample size, which was reflected in the statistical study that followed, it was concluded that the PEG hydrogel membrane functions as cell barrier and allows greater bone regeneration compared with a defect without membrane.

Further studies should be pursued, not only in a larger sample, but mostly with clinical trials in humans, and which compares the use of this hydrogel with other types of barriers.

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

## I - Contexto e Objetivos do Trabalho

Desde o início do VI Mestrado de Cirurgia Oral que a temática dos implantes e todas as matérias afins me cativaram de forma substancial. Se, por um lado, as condições naturais da presença de um leito ósseo favorável à reabilitação com implantes predispõem para uma maior facilidade na colocação dos mesmos, contribuindo para a previsibilidade do sucesso cirúrgico, por outro, perante as condições deficitárias dum leito ósseo, assumem-se como um desafio a transpor.

Desta forma, a temática da regeneração óssea com vista à posterior reabilitação com implantes é um tema atual e de indiscutível importância na prática clínica. A busca incessante do Homem pela simplificação de todos os processos reflete-se também na quantidade de novos produtos que surgem no mercado, na tentativa de simplificar o ato cirúrgico e promover a regeneração óssea e o sucesso clínico. No entanto, é imprescindível que quando a utilização de um novo produto seja sugerida, as reais vantagens da sua utilização estejam identificadas.

O hidrogel de polietileno glicol (PEG), material biocompatível e reabsorvível, tem vindo a surgir nalguns estudos para ser utilizado como membrana, apresentando como principal aliciente o fato de se formar *in situ*.

Após pesquisa bibliográfica, verifiquei que poucos são os estudos que se debruçam sobre esta nova membrana, cuja utilização se pretende tornar como referência na área, o que motivou a minha investigação sobre esta temática.

O presente estudo foi efetuado com o objetivo de testar a função de barreira celular de uma membrana reabsorvível de hidrogel de PEG formada *in situ* na regeneração óssea guiada. Secundariamente, pretendia-se observar os aspetos histológicos e histomorfométricos da regeneração óssea dos defeitos cranianos com e sem a membrana de PEG.

Tendo em consideração os pressupostos éticos que permitem a realização de ensaios clínicos em humanos, optei pela realização do estudo em modelo animal, escolhendo para o efeito ratos da espécie Wistar, uma vez que são de

fácil manipulação, pouco dispendiosos na sua aquisição e manutenção e já existem alguns estudos com este modelo, o que permite efetuar comparações.

Os resultados obtidos, com todas as limitações relativamente ao tamanho da amostra e métodos utilizados que serão discutidas em capítulo próprio, permitiram a realização de uma análise estatística relativamente à utilização de membrana de PEG *versus* a sua ausência, demonstrando a tendência de uma maior regeneração óssea nos defeitos com membrana.

A realização deste estudo suscitou o interesse em testar a eficácia de barreira celular no ser humano, podendo este tema vir a ser uma hipótese de trabalho para futura investigação, salvaguardadas todas as questões éticas associadas.

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos

## **II- Introdução**

# 1. Regeneração Óssea em Medicina Dentária

## 1.1- Introdução histórica

Desde muito cedo, na História da Medicina Dentária, se levantou a questão da perda óssea e a necessidade de regenerar o osso perdido, no contexto de algumas patologias, médicas ou cirúrgicas. No início do século XX, Macewen (1907) referiu pela primeira vez o conceito de regeneração óssea propondo-se obter dados, em estudos *in vivo*, assim como verificar qual o papel que os vários constituintes celulares desempenhavam no desenvolvimento e reprodução de osso, nomeadamente o perióstio e o músculo [1]. Em 1917, Brooks testou a regeneração e o crescimento ósseos, em ossos longos, em cães e coelhos, numa época em que não se tinham ainda certezas quanto às propriedades osteogénicas dos vários elementos do osso, nomeadamente o perióstio [2].

Em 1922, Dodds-Parker relatou dois casos de regeneração óssea após osteomielite em ossos longos, fémur e tíbia, que, segundo o autor, foram concluídos com sucesso [3]. May, em 1937, através de transplantes ósseos efetuados em cães, concluiu que o perióstio era essencial na regeneração óssea: quando estava presente e intacto verificava-se que o transplante se mantinha e havia ação dos osteoblastos; por outro lado, na ausência de perióstio, os transplantes ósseos acabavam por ser reabsorvidos [4].

O princípio, conhecido em geral como regeneração óssea guiada (ROG), foi descrito pela primeira vez, por Hurley *et al.* (1959), para o tratamento experimental da coluna vertebral. Nos anos 60, as equipas de Bassett e Boyne testaram filtros de laboratório microporosos de celulose de acetato (Milipore) para a reparação de defeitos corticais em ossos longos e para a reconstrução óssea facial. Os autores usaram estes filtros para estabelecer um ambiente adequado à osteogénese, excluindo as células do tecido conjuntivo fibroso dos defeitos ósseos. Sendo pioneiros, estes estudos não levaram, imediatamente,

ao uso generalizado das membranas em humanos. No entanto, a utilização de membranas que funcionam como barreiras para regeneração dos defeitos ósseos mudou significativamente na implantologia nos últimos 20 anos [5].

A perda óssea associada aos dentes está intrinsecamente ligada a problemas periodontais: gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar. Na tentativa de melhorar determinados aspetos periodontais, nomeadamente a perda dos tecidos periodontais, surgiu o conceito de regeneração tecidular guiada (RTG), conceito esse que pressupunha o restabelecimento de um novo periodonto, através do uso de membranas com o intuito de permitir que as células provenientes do ligamento periodontal migrassem no sentido coronal sem competirem com nenhuma(s) outras, e assim, pudesse haver um ganho de inserção. Em 1984, foram publicados os resultados dos primeiros estudos de regeneração tecidular guiada, efetuados em macacos [6] e, dois anos depois, os resultados obtidos em seres humanos [7], utilizando, em ambos os casos, membranas sintéticas.

Mais tarde, já em 1990, Nyman *et al.* utilizaram os princípios da RTG para regenerar osso alveolar em conjunto com a colocação de implantes de titânio. Num dos casos ocorreu uma completa regeneração óssea em redor do implante colocado num alvéolo pós-extracional onde tinham colocado uma membrana de Teflon a cobrir o implante. Num outro caso, em que se pretendia ganhar volume, altura e espessura, numa crista alveolar edêntula e reabsorvida, para posterior colocação de implante, aqueles autores tiveram igualmente sucesso - as membranas impediam a proliferação de células para além das que provinham do osso. Estas duas aplicações do princípio da RTG permitiram abrir caminho para a regeneração óssea [8]. No mesmo ano, Wachtel *et al.*, procuraram testar se uma técnica baseada na RTG seria capaz de regenerar osso em redor de implantes osteointegrados, em humanos. Para isso criaram três grupos. No grupo I colocaram grânulos de hidroxiapatite (HA) cobertos por uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), no grupo II colocaram apenas a membrana de PTFE-e e, no grupo III (de controlo) apenas a HA. No grupo I ocorreu total regeneração óssea, no grupo II houve uma regeneração parcial, e no grupo controlo os grânulos de HA foram



integrados no tecido conjuntivo. Concluíram, assim, que a aplicação de membranas de PTFE-e, em humanos, segundo a técnica da RTG, promove regeneração óssea em redor de implantes [9]. Também Buser *et al.* procuraram testar a eficácia da utilização da técnica de RTG com membranas de PTFE-e para aumento de volume de osso alveolar, em situações em que a anatomia não permitisse a colocação de implantes. Em 12 doentes, apenas tiveram insucesso em três, devido a infeção local [10].

No mesmo período (entre 1989 a 1992), além das novas técnicas cirúrgicas, foi introduzida a ROG, na Medicina Dentária, utilizando-se as membranas. Com base nos resultados de casos e estudos clínicos a curto prazo, diversos autores relataram os primeiros resultados com membrana para a regeneração de defeitos ósseos localizados em doentes com implantes [8, 10-14].

Em síntese, ao longo dos últimos 100 anos, vários métodos e técnicas cirúrgicas foram utilizados para promover a regeneração e o crescimento ósseo, em ossos longos ou osso alveolar. No caso do osso alveolar, o interesse e as preocupações com a regeneração óssea foram maiores face ao desenvolvimento de técnicas eficazes de colocação de implantes e a necessidade de criação de osso para a sua colocação, constituindo atualmente o seu principal objetivo.

## 1.2- Princípios Biológicos da Regeneração Óssea

### 1.2.1 - Generalidades

Para perceber a regeneração óssea, é necessário ter em conta a biologia do crescimento ósseo e todas as estruturas celulares intervenientes no processo de crescimento.

Na formação e crescimento ósseo, os osteoblastos são unidades fundamentais. Os osteoblastos são células responsáveis pela formação do

tecido ósseo, sintetizando os componentes da matriz orgânica e controlando a mineralização dessa matriz. Estas células estão localizadas na superfície óssea, promovendo a deposição da matriz ativa. Podem diferenciar-se em células ósseas alinhadas e em osteócitos. As células ósseas alinhadas são células alongadas que recobrem a superfície do osso e não apresentam atividade de síntese. Os osteócitos organizam-se como sincício e promovem uma vasta área de contacto entre as células e a parte não celular do tecido ósseo [15].

Para permitirem que ocorra a formação óssea num determinado local, as células progenitoras mesenquimatosas indiferenciadas (células osteoprogenitoras) podem migrar para o local, proliferar e evoluir para osteoblastos. Friedenstein (1973) dividiu as células osteoprogenitoras em células precursoras osteogénicas induzidas e determinadas [16]. As células precursoras osteogénicas determinadas estão presentes na medula óssea, e no endóstio e no perióstio que recobrem a superfície óssea. Estas células têm capacidade de proliferar e de se diferenciarem em osteoblastos. As células mesenquimatosas presentes noutros órgãos e tecidos, como por exemplo nos músculos, podem-se tornar células osteogénicas quando expostas a determinados estímulos. Como a osteogénese está intimamente relacionada com o crescimento vascular, as células perivasculares em forma de estrela (os pericitos) são consideradas as principais células osteoprogenitoras. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos a partir das células osteoprogenitoras dependem da libertação das proteínas ósseas morfogénicas (BMP) e de outros fatores de crescimento, tais como, o fator de crescimento da insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) [15].

Histologicamente, os osteoblastos são células cubóides extensas que formam uma camada única cobrindo o perióstio e o endóstio, superfícies onde a formação óssea ocorre. São células polarizadas que segregam osteoide apenas na direção da superfície óssea. O núcleo do osteoblasto é ovóide e o seu citoplasma evidencia retículo endoplasmático rugoso abundante, e um complexo de Golgi proeminente. Parece existir heterogeneidade dos

osteoblastos o que pode refletir diferenças entre os tipos de osso e/ou os locais anatómicos. Alguns osteoblastos tornam-se osteócitos pela inversão da secreção da matriz ou pelo aprisionamento na matriz óssea segregada por osteoblastos adjacentes.

A velocidade de deposição da matriz pode determinar o número de osteócitos embebidos. Isto é exemplificado na matriz osteóide, que é formada muito mais rapidamente do que qualquer outro tipo de osso e possui muitos osteócitos embebidos.

O osteócito fica aprisionado na matriz óssea dentro de uma lacuna, e os osteócitos adjacentes ficam interconectados por processos citoplasmáticos delgados, num sincício que se estende através do denso sistema canalicular ósseo [5].

A atividade de formação óssea está intimamente ligada à reabsorção óssea que é iniciada e mantida pelos osteoclastos. Os osteoclastos são células multinucleadas que se originam a partir de células precursoras hematopoiéticas, pertencentes à linhagem dos monócitos [5, 15]. A sua função primária é degradar a matriz óssea, o que ocorre em diversos contextos fisiopatológicos. São células gigantes, que diferem das células gigantes de corpo estranho. Encontram-se habitualmente nas lacunas de Howship. Coram positivamente para a fosfatase ácida tartarato-resistente. O tamanho dos osteoclastos varia entre 30 e 40µm e o número de núcleos, entre três e 30.

### 1.2.2- Matriz óssea

#### 1.2.2-1. Deposição e mineralização

O osteoblasto sintetiza uma mistura de macromoléculas que são segregadas no ambiente extracelular para formar a matriz óssea – o tecido osteóide ou pré-osso - que consiste numa matriz formada por proteínas colagenosas e outras. Na frente de mineralização, o tecido osteóide converte-se em osso mineralizado. A mineralização da matriz osteoide é iniciada pelas suas vesículas. Em contraste, as vesículas da matriz raramente são vistas no tecido osteóide do osso lamelar em mineralização [5].

A matriz óssea é, um composto biológico formado por água, citrato, magnésio, potássio, sódio e principalmente cristais de hidroxiapatite, moléculas de colagénio e macromoléculas não colagénicas. Além da sua função estrutural, a matriz óssea armazena macromoléculas com funções na biomineralização e nas interações célula-matriz, que servem, também, de reservatório para os fatores de crescimento e citocinas [5].

### 1.2.3- Cicatrização óssea

#### 1.2.3-1. Aspetos gerais

Designa-se como reparação, a cicatrização do tecido ósseo lesado com formação de um tecido que difere morfológica ou funcionalmente do tecido original. Em contrapartida, a regeneração tecidular é o processo pelo qual a cicatrização conduz a restauração integral da morfologia de função do tecido.

A cicatrização do tecido ósseo pode ocorrer como regeneração ou como reparação, dependendo das características da lesão. Por exemplo, uma pequena fratura óssea, devidamente estabilizada, irá cicatrizar por

regeneração, enquanto que, uma fratura extensa no osso irá frequentemente cicatrizar por reparação. A regeneração será abordada, posteriormente, de forma mais desenvolvida.

Existem diversos fatores que podem interferir com a formação do tecido ósseo após um traumatismo, tais como:

- 1- Falha na proliferação dos vasos sanguíneos para o interior do defeito;
- 2- Estabilização inadequada do coágulo e do tecido de granulação do defeito;
- 3- Crescimento de um tecido não ósseo com alta atividade proliferativa
- 4- Contaminação bacteriana.

#### 1.2.3.2- Cicatrização

A cicatrização do defeito envolve quatro fases:

- 1- Coagulação sanguínea
- 2- Limpeza do defeito ósseo
- 3- Formação tecidular
- 4- Modelação e remodelação tecidular

Estas fases da formação óssea, que a seguir se descrevem, ocorrem numa sequência ordenada, contudo em alguns locais do defeito pode ocorrer uma sobreposição de fases, de tal forma que, em certas áreas do defeito ósseo a formação tecidular pode estar em desenvolvimento, enquanto que noutras áreas, a modelação tecidular é a fase dominante.

## 1- Coágulo sanguíneo

Logo após a extração do dente por exemplo, o sangue dos vasos sanguíneos lesionados irá preencher a cavidade. As plaquetas aderem ao local da lesão vascular num processo mediado pelo fator de von Willebrand e pela ligação das plaquetas do colagénio endotelial. Com a agregação de mais plaquetas forma-se o trombo plaquetar oclusivo que para a hemorragia. Entretanto desenvolve-se uma malha de fibrina através de uma cascata de ativações sucessivas dos múltiplos fatores de coagulação. A malha de fibrina estabiliza o trombo plaquetar. O coágulo de fibrina age como uma matriz física que direciona os movimentos celulares e contém substâncias relevantes para a continuação do processo de cicatrização. Estas substâncias, por exemplo fatores de crescimento, influenciam as células mesenquimatosas e afetam as células inflamatórias, aumentando a migração de vários tipos de células, e induzindo a proliferação, diferenciação e atividade sintética dentro do coágulo.

Embora o coágulo sanguíneo seja crucial na fase inicial da cicatrização do defeito, a sua remoção é fundamental para permitir a formação de um novo tecido. Assim, passados poucos dias após a extração dentária, o coágulo sanguíneo vai começar a desorganizar-se, iniciando-se um processo denominado fibrinólise.

## 2- Limpeza do defeito

Antes de se iniciar a formação tecidular ocorre a migração de neutrófilos e macrófagos para o interior da ferida, os quais removem bactérias e tecido danificad. Em primeiro lugar, atuam os neutrófilos e só mais tarde os macrófagos. Estes últimos não estão envolvidos apenas na limpeza da ferida, mas também libertam fatores de crescimento e citotcinas que posteriormente promovem a migração, proliferação e diferenciação das células mesenquimatosas. Só depois dos resíduos terem sido removidos do local e a ferida se tornar “estéril”, os neutrófilos sofrem apoptose e os seus restos são

removidos pelos macrófagos. Seguidamente, os macrófagos abandonam a zona lesionada.

No local da extração, o osso traumatizado das paredes que circunscrevem a zona lesionada sofrerá necrose e será removida por meio dos osteoclastos. Assim, os osteoclastos também participam na fase de limpeza dos tecidos lesionados.

### 3- Formação tecidular

As células mesenquimatosas e as células semelhantes aos fibroblastos que, a partir da medula óssea, migram para o coágulo organizado, começam a proliferar e a depositar os componentes da matriz na zona extracelular. Desta forma, um novo tecido, o tecido de granulação, irá substituir gradualmente o coágulo sanguíneo.

Posteriormente, este tecido de granulação irá ser substituído por tecido conjuntivo provisório. A transição entre este último e a formação de tecido ósseo ocorre ao longo das estruturas vasculares. Assim, as células osteoprogenitoras migram e concentram-se nos vasos vizinhos, diferenciando-se em osteoblastos, os quais produzem uma matriz de fibras de colagénio imatura. O osteóide é então formado e o processo de mineralização inicia-se a partir da zona central. Ocasionalmente, estas células ficam aprisionadas na matriz e transformam-se em osteócitos. O novo osso formado é denominado osso imaturo.

### 4- Modelação e remodelação

Após a formação do osso imaturo, o tecido mineralizado começa a ser novamente formado e renovado. Esta ação, chamada de remodelação óssea, vai permitir a substituição de um osso “velho” por um “novo” envolve dois processos: a reabsorção óssea e a aposição óssea. A aposição óssea é um

processo de formação de novo osso através da ação dos osteoblastos que produzem novas células ósseas resultantes de um estímulo, como por exemplo aquando da movimentação dentária ortodôntica de baixa intensidade.

A modelação é o processo que permite a mudança da arquitetura óssea inicial. Tem sido sugerido que estímulos externos, tal como a carga, sobre o tecido ósseo podem iniciar a modelação. A remodelação, por outro lado, representa a alteração que ocorre dentro do tecido ósseo mineralizado sem uma alteração concomitante da arquitetura desse tecido. O processo de remodelação é importante durante a formação óssea e quando o osso maduro é substituído por novo osso. Durante a formação óssea, a remodelação permite a substituição do osso primário (osso imaturo), que apresenta pouca capacidade de suportar cargas, em osso lamelar, que é mais resistente a cargas.

Estes processos ocorrem ao mesmo tempo e são caracterizados pela presença das chamadas unidades ósseas multicelulares (BMUs).

A BMU é composta por uma área de osteoclastos residindo na superfície do osso recentemente reabsorvido – frente de reabsorção, uma área contendo vasos e pericitos e uma camada de osteoblastos presentes na matriz orgânica recém-formada – a frente de deposição. Estímulos locais e libertação de hormona do controle da remodelação óssea, tais como a hormona paratiroideia, hormona do crescimento, a leptina e a calcitonina estão envolvidas no controle e remodelação óssea. A modelação e remodelação ocorrem durante toda a vida para permitir que o osso se adapte aos estímulos e exigências internas e externas [15].

#### 4.1- Modelo de formação do tecido ósseo

A cicatrização de um alvéolo dentário pós-extração pode servir como um modelo para descrever os eventos tecidulares que levam à formação do tecido ósseo no defeito do processo alveolar.



Num estudo efetuado por Lindhe *et al.* [15] foram extraídos dentes pré-molares inferiores num grupo de cães, tendo sido monitorizadas, por biópsias, as cicatrizações alveolares obtidas, em vários intervalos de tempo após a remoção dos dentes.

Segundo este estudo, o alvéolo pós-extracional foi inicialmente preenchido por sangue e formou-se um coágulo no seu interior. As células inflamatórias migram para o seu interior e o processo de limpeza do defeito é iniciado. O coágulo é invadido por células mesenquimatosas e por tecido vascular e é formado um tecido de granulação que vai sendo substituído por um tecido conjuntivo provisório e é iniciada a formação de um novo tecido ósseo (osso primário). O alvéolo é gradualmente preenchido por esse osso primário que posteriormente sofre uma modelação e remodelação, transformando-se em osso lamelar e medular.

### 1.3- Definição de Regeneração

A regeneração é considerada como a substituição dos componentes removidos ou perdidos no organismo por elementos de igual organização estrutural, de tal forma que a estrutura e a função sejam restauradas por completo. A regeneração fisiológica é distinta da regeneração reparadora. Enquanto na regeneração fisiológica ocorre a substituição contínua de células que morrem e são removidas sem ocorrência de processo inflamatório, e elementos tecidulares, na regeneração reparadora ocorre quando os tecidos são perdidos por trauma ou doença [5].

#### 1.3.1 – Regeneração Tecidular Guiada

Os princípios da RTG têm como base os estudos realizados em animais desde o início dos anos 80. Gottlow *et al.* em 1984, num estudo em macacos, colocaram membranas a cobrir raízes de dentes. Nos casos em que ocorreu colapso da membrana, verificou-se a formação de cimento na superfície das raízes. Nos casos em que a membrana permitiu o efeito de tenda, observou-se a formação de osso e de tecido conjuntivo aderido à superfície dentária, mesmo em zonas onde nunca tinha existido osso. Esta constatação sugere que o princípio da RTG também pode ser aplicado com sucesso na regeneração óssea, através da criação de uma cavidade que apenas pode ser invadido por células com capacidade de formação óssea de osso existente [6]. Chama-se neste caso específico Regeneração Óssea Guiada. O “efeito tenda”, anteriormente referido, é o espaço virtual criado com a colocação de uma membrana sobre uma determinada superfície. Isto só é possível genericamente de três formas: ou através de uma membrana rígida, não reabsorvível, a qual é moldável à forma que pretendemos, ou pela colocação de material de preenchimento ósseo, de forma a evitar o colapso das membranas não rígidas, ou se a anatomia do defeito ósseo ou a presença de, por exemplo, um implante permitam sustentar a membrana não rígida de forma a manter o espaço para regeneração óssea.

#### 1.3.1.1- Estudos de experimentação animal

Muitas vezes os termos RTG e ROG são confundidos e usados como sinónimos ou de forma inadequada. Enquanto que a RTG é a regeneração do aparelho de sustentação periodontal, onde se inclui o cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, a ROG envolve apenas a formação óssea [5].

A aplicação dos princípios da RTG para ROG foi pela primeira vez introduzida por Dahlin *et al.*, em 1988, num estudo experimental em ratos. Foram criados defeitos transmandibulares bilaterais com 5mm de diâmetro. Os locais de teste foram cobertos com uma membrana de forma a que houvesse apenas migração de células a partir do osso mandibular e, ao mesmo tempo, evitar que

o tecido fibroso proliferasse para o defeito. Os locais de controlo foram deixados sem membrana. No local de teste verificou-se, após seis semanas de regeneração, a formação quase completa de osso, quer por visualização direta, quando do descolamento dos tecidos, quer por estudo histológico. Por outro lado, os locais de controlo apresentaram defeitos residuais transmandibulares, apesar de em alguns se ter observado diminuição do diâmetro após nove semanas, devido ao facto dos tecidos moles terem invadido os defeitos, impedindo as células de regeneração de ocupar o espaço vazio [17].

Kostopoulos e Karring (1994) obtiveram resultados semelhantes, em modelos experimentais com ratos, nos quais foram criados defeitos mandibulares padronizados cobertos, por sua vez, com uma membrana reabsorvível. O ramo mandibular foi exposto dos dois lados e foi criado um defeito com 2x3mm no bordo inferior. Os defeitos foram cobertos com uma membrana reabsorvível, enquanto que os lados contralaterais se mantiveram descobertos. As amostras revelaram que houve um preenchimento mínimo nos defeitos controlo, enquanto que nos defeitos teste cobertos com membrana cicatrizaram por completo. A nível histológico, a regeneração óssea apenas ocorreu no primeiro mês após a cirurgia, atingindo uma regeneração de 48% do defeito em 180 dias nos controlos, enquanto que nos lados teste essa regeneração ocorreu em 85% da profundidade do defeito no mesmo período de tempo [18].

#### 1.3.1.2- Aplicações Clínicas em Medicina Dentária

Com os diversos trabalhos efetuados em modelos animais, foi possível transpor para o humano diversas aplicações dos estudos de ROG com a utilização de membranas, de modo a produzir resultados previsíveis no tratamento de situações como o encerramento de defeitos ósseos alveolares, o aumento do rebordo alveolar, as deiscências e fenestrações ósseas alveolares

associadas aos implantes ou à colocação de implantes imediatos à extração dentária [15].

#### 1.3.1.2.1- Encerramento do defeito ósseo alveolar

Quando existe um defeito ósseo com bordos bem definidos, basta a colocação de uma membrana rígida, como, por exemplo, uma membrana de PTFEe, para conseguirmos obter regeneração óssea nesse local [15]. Com a utilização de membranas não rígidas, será aconselhável a colocação de um material de preenchimento ósseo, ou qualquer outra forma de manter o espaço para evitar o colapso da membrana.

#### 1.3.1.2.2- Aumento do rebordo alveolar

Relativamente aos rebordos ósseos alveolares, o volume ósseo é muitas vezes insuficiente para a colocação de um implante, sendo necessário proceder a um aumento desse mesmo rebordo. Ao contrário dos defeitos ósseos delimitados por paredes ósseas que garantem a manutenção do espaço isolado, exclusivamente para que as células osteogénicas possam proliferar, no caso de um maxilar atrófico, tal espaço terá de ser criado para o aumento da crista óssea.

Uma série de casos e estudos clínicos [8, 10, 19-23] foram iniciados para desenvolver um protocolo cirúrgico promovendo resultados previsíveis no tratamento do aumento localizado de rebordos e, que permitiram, posteriormente, validar a técnica [5]. Em todas estes estudos experimentais foi colocada uma membrana de PTFEe intimamente adaptada à superfície ósseas

em redor dos defeitos e fixada com pinos ou parafusos de fixação, enquanto que o espaço sob a membrana foi mantido por meio de um parafuso desenhado especialmente para suporte (Memfix®, Straumann Institute, Waldenburg, Suíça) [5]. Para evitar o colapso da membrana, foram colocados enxertos de osso autólogo como suporte das membranas. A experiência clínica teve resultados excelentes que foram apresentados num relatório metodológico [20, 21]. Os critérios essenciais para o sucesso desta técnica são:

- a. conseguir uma cicatrização primária do tecido mole, para evitar a exposição da membrana pela utilização da técnica de incisão lateral;
- b. criação e manutenção de um espaço isolado sob a membrana para evitar o seu colapso, pela utilização de um suporte apropriado para a membrana, com ou sem enxertos ósseos e/ou materiais osteocondutores;
- c. estabilização e uma firme adaptação da membrana no osso de suporte para impedir o crescimento de células concorrentes não-osteogénicas para dentro da área do defeito, com a utilização de parafusos ou pinos de fixação;
- d. permitir um período adequado de cicatrização de pelo menos 6-7 meses, para se obter uma completa regeneração e maturação óssea.

A técnica preconizada envolve a combinação de um retalho dividido com um retalho total mucoperiósseo estendendo-se entre os dentes adjacentes ao defeito. Deve haver precaução com a incisão inicial no local sobre o tecido ósseo intacto distante do defeito ósseo. Não deve ser feita incisão vertical no local, devendo as incisões estender-se dentro do sulco gengival dos dentes adjacentes.

Após a elevação do retalho, o tecido mole no interior do defeito é cuidadosamente removido. A barreira (membrana) é ajustada e adaptada para cobrir o defeito ósseo e 3-4 mm do osso intacto circundante, mas evitando contacto com os dentes vizinhos, se se tratar de uma membrana não

reabsorvível. Com as membranas reabsorvíveis, como por exemplo as de colagénio, este problema já não se coloca. Em situações em que há risco de colapso da membrana para o interior do defeito, devem ser colocados pinos de fixação ou miniparafusos para suportar a membrana, mantendo isolado o espaço criado.

O osso cortical que reveste o defeito é perfurado até ao osso medular subjacente. Os retalhos mucoperiósseos são subsequentemente reposicionados e firmemente suturados. O controlo pós-cirúrgico da placa bacteriana inclui dois bochechos diários com clorhexidina. Deve-se ter cuidado para não tocar ou pressionar a área cirúrgica enquanto se utiliza a prótese temporária. O ideal é recorrer a uma ponte fixa do tipo Maryland. A sutura é removida após 14 dias. A nova abordagem cirúrgica é feita passados 6-8 meses.

#### 1.3.1.2.3- Deiscências e fenestrações ósseas alveolares associadas aos implantes

Uma deiscência no implante é definida como uma exposição do implante, desde o topo até ao ponto onde o implante está totalmente coberto por osso. A fenestração do implante ou janela da superfície exposta do implante resulta de uma largura vestibulo-lingual de osso alveolar insuficiente ou de uma inclinação inadequada, no momento da colocação do implante.

Jovanovic *et al.* (1993) avaliaram o potencial de regeneração óssea em locais de implantes com deiscência, num estudo clínico com 11 doentes. Foram estudados 19 implantes de titânio com roscas expostas. Foi colocada uma membrana sobre o local dos implantes expostos e presa com o parafuso de fecho do implante, com o objectivo de se criar um espaço isolado para a formação óssea. De seguida, os implantes foram totalmente cobertos pelos retalhos. A avaliação clínica do tratamento foi feita 4, 5 e 6 meses após a cirurgia inicial. Catorze dos 19 locais de implantes com deiscência apresentaram 100% de preenchimento ósseo no espaço criado pela

membrana. Além disso, também ocorreu aumento do rebordo alveolar nesses locais. No entanto, nos casos em que a membrana e o implante ficaram expostos, ocorreu uma regeneração óssea mínima. No período de seis a 12 meses após a conexão da prótese, 12 dos 19 implantes foram avaliados radiograficamente e foi medida uma perda óssea média de 1,73mm [24].

#### 1.3.1.2.4- Colocação de implantes imediatos à extração dentária

A colocação de implantes no momento da extração de um dente é apelidada de “colocação de implante imediato”.

Diversos autores têm descrito a colocação de implantes nos alvéolos pós-extracionais e um aumento desses locais com membranas [8, 11, 14].

Num estudo clínico prospectivo multicêntrico (Becker et al. 1994) foram avaliados implantes que foram colocados nos alvéolos de dentes extraídos e tratados por RTG [25]. Dos 49 implantes, três foram perdidos por receberem carga. Esses implantes apresentaram uma exposição prematura da membrana. Após 3 anos, 93,9% dos implantes permaneciam funcionais. A formação óssea adjacente aos implantes está relacionada com a retenção da membrana. Os locais onde não ocorreu exposição da membrana apresentaram uma grande quantidade de preenchimento ósseo no alvéolo (média de 4,8mm) quando comparados com os locais onde as membranas ficaram expostas prematuramente e foram removidas (média de 4,0mm).

Mais recentemente, num estudo efetuado por Rosenquist & Grenthe (1996), 109 implantes Nobel Biocare colocados imediatamente em alvéolos pós-extracionais foram avaliados por um período máximo de 5,5 anos (média de 2,5 anos) após o tratamento. A taxa de sobrevivência dos implantes foi de 94% e a taxa de sucesso de 92% [26].

### 1.3.2 – Regeneração Óssea Guiada

A perda óssea alveolar, seja por doença periodontal, edentulismo prolongado ou por trauma, limita muitas vezes a possibilidade de reabilitação oral com implantes. A técnica de ROG é muito utilizada para o tratamento de defeitos ósseos alveolares. É baseada no conceito da utilização de uma barreira para criar um espaço para o qual as células originárias do tecido ósseo possam crescer sem a migração ou interferência das células de rápido crescimento do tecido conjuntivo ou tecido epitelial [5, 6, 27]. Muitas técnicas de aumentos laterais da crista óssea alveolar têm sido sugeridas de modo a contornar este problema, aumentando o osso em largura. Entre estes, a ROG tem sido largamente utilizada. A ROG envolve a colocação de uma barreira de modo a prevenir a invasão de células, não formadoras de osso, dos tecidos moles adjacentes para dentro do defeito e ao mesmo tempo vai permitir que haja tempo e espaço para que as células osteogénicas preencham o defeito [28],[29],[30],[31]. Esta técnica, chamada de regeneração óssea guiada (ROG), foi introduzido há mais de duas décadas[17] e provou ser útil no crescimento de um volume ósseo necessário e adequado para cobrir na totalidade os implantes [32]. Na última década passou a ser o procedimento *standard* para o tratamento de defeitos ósseos à volta de implantes. Segundo Dahlin et al., o conceito básico da regeneração óssea guiada envolve a colocação de uma membrana para proteger o coágulo e criar um espaço em redor do defeito ósseo, permitindo às células formadoras de osso migrarem sem competição por células de outros tecidos [17].

Várias revisões sistemáticas têm confirmado a efetividade das técnicas de ROG para aumento das dimensões das cristas ósseas alveolares atroficas [33-35].

Nos últimos 10 anos, a técnica de ROG tornou-se o padrão de tratamento para a regeneração de defeitos ósseos localizados nos doentes com implantes. Aghaloo e Moy (2007) demonstraram, numa revisão sistemática, que implantes colocados em conjunto com o procedimento de ROG possuem taxas de



sobrevivência favoráveis e que este procedimento é a única técnica cirúrgica bem documentada, entre as diversas técnicas utilizadas para o aumento localizado do rebordo [36].

O procedimento de ROG selecionado deve tentar sempre preencher os objetivos primários e secundários numa determinada situação clínica. Os objetivos primários da ROG são a obtenção de uma regeneração óssea bem-sucedida na área do defeito, com alta previsibilidade e baixo risco de complicações. Os objetivos secundários são a obtenção de um resultado bem-sucedido com menos intervenções cirúrgicas, a baixa morbidade para o doente e período de cicatrização reduzido [5].

## 1.4 – Materiais utilizados para regeneração em Medicina Dentária

### 1.4.1 - Membranas: materiais e função

Na cirurgia óssea reconstrutiva, uma barreira é usada para impedir a invaginação de tecido conjuntivo nos defeitos ósseos. Ao colocarmos uma membrana sobre um defeito ósseo, aquele fica em contacto direto com a superfície do tecido ósseo circundante, mantendo o perióstio na superfície externa da membrana. O retalho mucoperiosteal deve ser reposicionado e suturado, criando-se um espaço onde apenas as células do osso adjacente podem migrar [5].

O uso de membranas tornou-se o padrão de tratamento nos procedimentos cirúrgicos na ROG e na RTG na cavidade oral, para o tratamento dos defeitos ósseos peri-implantares e periodontais, assim como nos procedimentos de aumento ósseo antes ou simultaneamente à colocação dos implantes [32, 37].

Várias investigações experimentais e estudos clínicos têm avaliado o impacto biológico de diferentes membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis e de substitutos ósseos para permitir a regeneração de defeitos críticos [38-43].

Uma membrana, para servir como barreira física entre células, tem de preencher uma série de requisitos, tendo em conta o objetivo que se pretende, alcançar com o seu uso. Tem de funcionar como barreira tecidular, impedindo a invasão de células provenientes dos tecidos moles circundantes; tem de ser biocompatível e estável [32, 44], de permitir a integração tecidular, de ser permeável aos nutrientes, de ter a capacidade de manter espaço e também de ser de fácil utilização clínica [32].

Na prática clínica, a regeneração tecidular necessita normalmente de ser guiada para resultar numa nova e funcional fisiologia. Na implantologia, por exemplo, as membranas ajudam a repor o tecido ósseo através da manutenção de espaço para o crescimento ósseo e para prevenir a competição entre a regeneração óssea e a penetração dos tecidos moles [17], ou seja, na separação da área a regenerar e os tecidos moles adjacentes.

No caso de membranas reabsorvíveis, estas têm vários tempos de reabsorção. No entanto, para que haja tempo para as células osteogénicas promoverem a regeneração óssea, as membranas têm de ter um tempo mínimo de atuação de cerca de 3-4 meses.

Hoje em dia, encontramos no mercado uma vasta oferta de membranas, com materiais de distintas origens e composições, e com diversos tipos de apresentações.

No que respeita às membranas não reabsorvíveis, são exemplo as de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) com e sem malha de titânio no interior. Estas membranas tendem a ficar expostas, precisam de uma segunda cirurgia para a sua remoção e podem induzir reações celulares graves [45, 46]. Por isso, as membranas reabsorvíveis tornaram-se uma alternativa viável, uma vez que não estão associadas a estes problemas [47, 48].

São vários os materiais utilizados no fabrico destas membranas, entre os quais, a duramáter (de origem animal), o ácido poliláctico e poliglicólico, e o poliuretano[49], para além das mais comuns e divulgadas membranas de colagénio.

Hoje em dia, as membranas reabsorvíveis feitas de colagénio tornaram-se num *standard*, numa série de situações clínicas [48, 50-52]. No entanto, quando comparadas com as membranas não reabsorvíveis, revelaram piores resultados a nível da preservação do osso marginal na regeneração peri-implantar [53].

Vários estudos animais e clínicos demonstraram ganhos no osso marginal, utilizando membranas reabsorvíveis em combinação com material de preenchimento osteocondutor, o qual evita o colapso das membranas [53-57]. De acordo com estas investigações, há dois atributos principais que são desejáveis; a função de barreira e a manutenção do espaço [40].

As membranas de colagénio, sendo as membranas reabsorvíveis com maior expressão no mercado, falham na falta de rigidez para manutenção do espaço e tendem a colapsar[55]. Outra desvantagem é que as membranas de colagénio são pré-fabricadas em tamanhos *standartizados* e precisam de ser adaptadas à morfologia do local recetor[40]. Desta forma, a individualização da forma e tamanho consome tempo e complica o procedimento, o que limita o uso de membranas no dia-a-dia da prática clínica[58].

O colagénio pode ter várias origens, sendo as mais comuns e que são comercializadas, as de origem bovina, porcina e equina. Os estudos mais atuais focam-se no uso de produtos derivados de colagénio bovino ou porcino tipo I e tipo III [37]. Devido ao risco de transmissão de agentes infecciosos não poder ser totalmente excluído dos produtos de origem animal, foram desenvolvidas barreiras sintéticas feitas de ácido poliláctico ou poliglicólico (PLA) [40, 59].

Algumas das vantagens do colagénio sobre outros materiais incluem a capacidade hemostática, o que permite uma estabilização da cicatrização mais precoce, as propriedades quimiotáticas, o que permite atrair fibroblastos, e alguma permeabilidade para facilitar a transmissão de nutrientes [60-62].

A maior desvantagem da membrana de colagénio é a sua rápida biodegradação, por acção enzimática dos macrófagos, dos leucócitos

polimorfonucleares e das bactérias periodontopáticas, resultando numa pior resistência da membrana ao colapso e comprometendo, assim, a ferida operatória[61-63].

As ligações cruzadas químicas e enzimáticas dos colagénios tipos I e III de origem bovina e porcina oferecem uma biodegradação mais prolongada, mas, em contrapartida, estão associadas a reações de corpo estranho pronunciadas, assim como, a uma diminuição da integração tecidular e vascularização transmembranosa [61, 62, 64, 65].

Mais recentemente têm sido estudadas membranas feitas de hidrogel de polietileno glicol (PEG). Os hidrogéis feitos de PEG preenchem uma série de critérios necessários para servir como membranas sintéticas formadas *in situ* [39].

#### 1.4.1.1 – Membranas não reabsorvíveis: materiais e aplicabilidade

As membranas não reabsorvíveis mais difundidas no mercado são as fabricadas em PTFE-e. Muitas vezes estas membranas têm associado no seu interior uma rede de titânio, que lhes confere rigidez, mas com algum grau de maleabilidade. A rigidez permite fazer o efeito de tenda, sendo eventualmente desnecessários os substitutos ósseos[5]. Por sua vez, a maleabilidade permite uma adaptação o mais próxima possível do desejado.

No passado, a utilização de membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) provou serem efetivas na ROG [13, 19, 66, 67]. O sucesso destas membranas tornou-as no *gold standard* na ROG [68, 69]. No entanto, a exposição de membranas e a inflamação que provocavam, resultando em deiscências do tecido mole e comprometendo a regeneração óssea, foram reportadas por várias vezes em diversos estudos [25, 66, 67, 70-

72]. Assim, era cada vez mais necessário encontrar membranas que colmatassem estas falhas.

#### 1.4.1.2 – Membranas reabsorvíveis: materiais e aplicabilidade

Nos finais da década de 90, as membranas não reabsorvíveis começam a ser trocadas por reabsorvíveis, no sentido de evitar uma segunda cirurgia para a referida remoção da membrana [5, 73]. Face aos problemas gerados pelas membranas não reabsorvíveis, surgiram no mercado as membranas reabsorvíveis de colagénio, as quais, devido à boa integração nos tecidos moles [64], vieram a ser as mais divulgadas em termos de membranas reabsorvíveis na ROG [5, 32].

Uma outra questão relativa às membranas e que lhes é comum, prende-se com o fato do seu fabrico terminar antes de serem aplicadas ao doente. Consequentemente, todas elas são fabricadas em tamanhos e formas *standards* e precisam de ser adaptadas para a situação de cada doente [39, 44, 74-76]. De forma alternativa, pode-se criar uma membrana diretamente para um determinado defeito durante a cirurgia, utilizando um material diferente dos anteriormente referidos [39]. Especialmente para morfologias mais complicadas, ou locais de difícil acesso, uma membrana líquida formada *in situ*, ofereceria um conjunto de vantagens [44].

Neste sentido, foram desenvolvidas e investigadas várias membranas reabsorvíveis feitas de colagénio ou ácido poliglicólico e/ou poliláctico [39, 40, 75]. Tendo em conta os bons resultados parcialmente baseados no baixo grau de complicações, as membranas reabsorvíveis começaram a ser aceites como o *standard* para a maioria das situações clínicas [5, 39, 74].

Uma destas membranas, feita de PLA dissolvido em N-metil-2-pirrolidona (NMP) (Atrisorb®), foi testada por diversos autores [77-79]. Esta membrana é

aplicada sob a forma de um líquido, eliminando, assim, a adaptação prévia e manipulação das membranas pré-fabricadas. Esta membrana de PLA demonstrou ter boa resposta tecidual, biocompatibilidade e ser eficaz como barreira na promoção de regeneração óssea em defeitos periodontais [78].

Além disso, estudos feitos por Rosen & Reynolds, em 2001, demonstraram o sucesso destas membranas na ROG em deiscências e fenestrações ósseas [80] .

Num estudo efetuado por Strietzel *et al.*, em 2006, ficou demonstrado que as membranas reabsorvíveis e biodegradáveis eram eficazes na prevenção da penetração tecidual do tecido conjuntivo, mas falham na manutenção do espaço [55], um dado também corroborado por Buser *et al.*[5].

#### 1.4.1.2.1 - Membrana de Polietileno Glicol

Mais recentemente, diferentes estudos introduziram um hidrogel feito de PEG para a utilização em regeneração óssea [39, 81]. Atualmente é aplicado em diversas aplicações farmacêuticas (Zalisky & Harris 1997), como, por exemplo, componente de anestésico tópico (Xilonibsa®, Lidocaína em spray, Inibsa), e para dispositivos médicos, como por exemplo, penso dérmico em spray [82], barreira adesiva em procedimentos abdomino-pélvicos[83], como penso para aumento da retenção da sutura da duramáter após cirurgia crânio-encefálica[84] e como selante para fissuras à volta das suturas em vasos sanguíneos naturais ou artificiais[85]. Mais tarde, foram feitos significativos esforços de investigação no sentido da utilização de hidrogéis de PEG biodegradável para penetração tecidual e libertação controlada de produtos biológicos ativos [81, 86-88].

Os hidrogéis feitos de polietileno glicol (PEG), preenchem os critérios necessários para servir de membrana sintética formada *in situ*. Vários estudos

demonstram que o PEG é altamente biocompatível [39, 44, 75, 76], biodegradável e é uma barreira celular, indo, assim, ao encontro dos requisitos para servir como membrana [39, 44].

Em 2006, num estudo realizado em coelhos, Jung *et al.* demonstraram que a membrana de PEG pode ser utilizada com sucesso como uma membrana biodegradável para ROG em defeitos não críticos. Após quatro semanas, a membrana estava ainda presente, não sendo observado qualquer tipo de reação tecidular e as análises histomorfométricas demonstraram quantidades semelhantes de osso formado, comparativamente com as membranas *standard* de PTFEe. Ao contrário da membrana de PTFEe, a membrana de PEG ficou em geral bem adaptada ao defeito ósseo, não necessitando qualquer tipo de parafusos para estabilização da mesma [39].

Num estudo animal elaborado por Wechsler *et al.* (2008), foi testada a função de barreira do PEG após colocação subcutânea em ratos. As análises histológicas revelaram prevenção da penetração celular acima dos quatro meses [44]. Herten *et al.* (2009) referem que a duração da membrana pode alcançar os quatro a seis meses [76].

Thoma *et al.* (2008), num estudo que efetuaram em ratos, demonstraram que a membrana de PEG utilizada no estudo para cobrir um defeito ósseo, evitou o colapso dos tecidos moles, tendo obtido um resultado semelhante à membrana de ácido poliláctico. A combinação de esponja de colagénio e a membrana de PEG demonstrou menor infiltração tecidular aos 10 dias e promoveu mais formação óssea aos 21 dias[40].

Em 2008, Jung *et al.*, num estudo realizado em cães, demonstraram que a membrana de PEG era segura e não provocava reação tecidular significativa, comparativamente com a de colagénio. Ambas as membranas revelaram quantidades semelhantes de neoformação óssea [59].

Num ensaio clínico randomizado com 37 doentes, em que comparou a utilização de uma membrana de PEG com uma membrana *standard* de colagénio, para avaliar o crescimento ósseo vertical em defeitos preenchidos

com osso bovino, o mesmo autor demonstrou que ambas as membranas se comportaram de maneira semelhante em relação à quantidade de situações resolvidas. No entanto, a membrana de PEG revelou mais complicações no tecido mole do que a de colagénio. É, contudo, mais fácil e simples de manipular, o que se traduz num menor tempo de aplicação [74].

Humber *et al.* (2010), num estudo realizado em coelhos, demonstraram que apesar das propriedades de barreira do hidrogel de PEG, é necessário ter algum cuidado com o seu uso na ROG, quando esta envolve defeitos sem suporte, pois ocorre o colapso dos tecidos[75].

Num outro estudo, Schwarz *et al.* (2011) procuraram testar, em cães, a influência de duas membranas e dois tipos de material de regeneração misturado com osso autólogo para ROG e na osteointegração de implantes de titânio [89]. Num idêntico estudo, Mihatovic *et al.* (2011) testaram, também em cães, duas membranas reabsorvíveis e dois tipos de material de regeneração óssea, osso autólogo e fosfato de cálcio bifásico na osteointegração de implante. Ambos os estudos demonstraram que todos os métodos utilizados na investigação resultaram em regeneração óssea. No entanto, as análises histológicas evidenciaram um aumento dos valores da área tratada nos locais regenerados com PEG, comparativamente com os correspondentes locais regenerados com membrana de colagénio [89, 90].

Wehrhan *et al.* (2012) fizeram um estudo com vista a verificar se uma matriz de PEG seria apropriada como transportadora celular de BMP-2 num modelo animal, em defeitos cranianos de porcos. Foram utilizados dois tipos de PEG: matriz de PEG, cuja degradação se dá em 10 dias, e membrana de PEG, cuja degradação se dá em 120 dias. Esta última apenas foi colocada num dos grupos em estudo. Os animais foram sacrificados às duas, quatro e 12 semanas. Verificou-se que a membrana de PEG se manteve no local, sem sinais de perda de integridade após as 12 semanas [91].

Mais recentemente, Ramel *et al.* (2012) procuraram determinar se uma membrana de PEG poderia proporcionar resultados clínicos e radiográficos semelhantes a uma membrana de colagénio, ambas na combinação de



material de suporte da membrana, em períodos de controlo de um e três anos. O estudo envolveu doentes a necessitar de tratamento com implantes e com defeitos ósseos consideráveis a nível posterior, em ambos os maxilares. Os defeitos à volta dos implantes foram preenchidos com osso bovino desproteínizado e coberto com a membrana de colagénio ou com a membrana de hidrogel de PEG. A reentrada cirúrgica foi feita aos seis meses para colocação de próteses provisórias parciais fixas. Os doentes foram examinados clínica e radiograficamente ao fim do primeiro ano e do terceiro após a reentrada. A sobrevivência dos implantes foi de 100% e os tecidos periimplantares estavam saudáveis, sem diferenças entre os dois grupos. O estudo demonstrou que a membrana de hidrogel de PEG foi tão eficaz como a de colagénio no tratamento de deiscências à volta dos implantes após um período de 1 e 3 anos [92].

Zambon *et al.*, também em 2012, avaliaram histologicamente o efeito da carga sobre osso regenerado em deiscências à volta de implantes quando tratados numa abordagem combinada de osso de regeneração e ROG. O estudo foi feito em 12 “mini pigs” da raça Göttingen, estando divididos em 3 grupos, dois teste e um controlo. Num dos grupos teste, foi colocado apenas substituto ósseo sintético, Straumann Bone Ceramic®, SBC, Straumann AG, e no outro grupo foi conjugada a colocação SBC com uma membrana de PEG (Straumann MembraGel®, Straumann AG). No grupo controlo deixou-se a deiscência sem qualquer tratamento. Nalguns implantes foram colocados parafusos de cicatrização altos para simular as cargas. Foi feita análise histológica dois meses após a cirurgia. Em termos de formação óssea, os locais tratados com SBC e membrana de PEG exibiram os valores mais elevados de área de osso regenerado [31].

Para além dos aspetos referidos anteriormente, a integração tecidular dos hidrogéis de PEG é determinante para os objetivos a que se destina. Esta integração tecidular pode ser melhorada através da adição da sequência de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), a qual é reconhecida por vários tipos de células para a cicatrização tecidular, incluindo macrófagos, fibroblastos, linfócitos, plaquetas e células endoteliais, durante a interação com os recetores

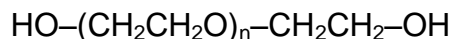
de integração da membrana extracelular [93, 94]. Por outro lado, PEG modificado com RGD, contendo péptidos com ligações covalentes da hormona paratiroide, provou aumentar a regeneração óssea a um nível equivalente ao osso autógeno [95, 96].

O princípio da formação *in situ* do hidrogel de PEG é baseado nas ligações cruzadas de dois componentes de PEG através dos seus grupos terminais reativos. A reação de ligações cruzadas processa-se rápida e seletivamente com um pH e da temperatura fisiológicos, formando uma rede de ligações éster hidrolizáveis [88]. Apesar disso, a hidrólise está principalmente dependente no pH e temperatura, e a sua taxa pode ser influenciada pela composição dos seus componentes de PEG [76].

Um estudo de Herten *et al.* (2009) investigou o padrão da integração tecidular imunohistoquimicamente, a angiogénese transmembranar e a subsequente biodegradação de diferentes tipos de hidrogéis de PEG, com diferentes concentrações e modificados com aminoácidos, comparativamente com uma membrana de colagénio. Este estudo demonstrou que os hidrogéis de PEG modificados revelaram uma elevada biocompatibilidade, a qual foi facilmente identificada por uma integração tecidular inicial sem distúrbios, assim como pela ausência de sinais de reações inflamatórias no tecido conjuntivo adjacente. Os autores puderam concluir que todas as modificações de PEG investigadas no estudo obtiveram uma biocompatibilidade equivalente à das membranas de colagénio [76]. Resultados semelhantes foram já referidos num estudo de Wechsler *et al.* (2008), que concluiu haver uma elevada integração tecidular e que a biodegradação dos hidrogéis está dependente na composição do PEG [44].

#### 1.4.2.2.2 - Propriedades químicas do PEG

O PEG, na sua forma mais comum, é um poliéter linear ou ramificado com terminação de grupos hidroxilo, possuindo quimicamente a seguinte fórmula:



O PEG é sintetizado por uma polimerização aberta do anel aniónico de óxido de etileno iniciado pelo ataque de um ião hidróxido no anel epóxido [97]. É, portanto, um polímero formado pela conjugação de vários monómeros de etileno glicol.

#### 1.4.2.2.3 - Membrana de hidrogel de PEG Straumann® MembraGel

O Straumann® MembraGel é uma membrana sintética, estéril e degradável que se destina à utilização única num doente. É constituído por dois líquidos de polietileno glicol (PEG) que depois de estarem misturados formam um hidrogel. Este hidrogel é aplicado como um líquido viscoso e gelifica no local de aplicação dentro de aproximadamente 20 a 50 segundos. Atua como barreira que inibe as células não osteogénicas do tecido mole que se localiza por cima do defeito, apoiando assim a regeneração do osso alveolar. A degradação do Straumann® MembraGel por hidrólise é iniciada durante a cicatrização normal da ferida. Este produto deve ser conservado no frigorífico a uma temperatura de 2 a 8°C. O volume de aplicação deste gel é de 0,8ml par uma cobertura de aproximadamente cinco a sete cm<sup>2</sup>.

Indicações de utilização

É usado como membrana para fixação do substituto ósseo e para apoiar a regeneração e integração dos componentes do tecido oral nos procedimentos de regeneração óssea guiada, o que inclui o tratamento cirúrgico de defeitos peri-implantares, defeitos ósseos e rebordos alveolares insuficientes e alvéolos de extração.

## Componentes

O Straumann® MembraGel é apresentado sob a forma de seringas. Cada kit contém duas seringas de vidro, cada uma com um componente PEG (PEG A e PEG B) e montada num suporte de plástico, duas seringas de plástico, cada uma com um Ativador (Ativador A e Ativador B), num suporte de plástico e uma ponta aplicadora de auto mistura.

O componente PEG A contém um corante azul biocompatível que é responsável pela cor azul-turquesa da mistura final dos componentes e que assegura um controlo visual da aplicação. O tecido mole em contacto com o hidrogel não irá sofrer uma descoloração permanente.

Uma vez iniciada a aplicação, o material que se encontra na ponta do aplicador também irá gelificar se permanecer aí mais de 20 segundos, por isso, a aplicação deve realizar-se de forma contínua, se possível, sem interrupção.

## Instruções de utilização

Para facilitar o manuseamento e acelerar a gelificação é vantajoso que todos os componentes tenham atingido a temperatura ambiente antes de começar o processo de mistura, o que pode levar até 30 minutos depois de terem sido tirados do frigorífico. O hidrogel deve ser utilizado nos 45 minutos seguintes ao início do processo de mistura. A mistura dos componentes PEG e respetivos ativadores são misturados à medida que o conteúdo de uma seringa é

totalmente inserido na outra, o que tem de ser feito pelo menos 15 vezes para garantir uma mistura completa e homogénea. Depois da mistura, os PEGs diluídos têm de ser transferidos para o dispositivo dos componentes PEG.

Após a gelificação, o material previne a penetração celular e o contacto direto dos tecidos. A partir de um certo momento, aproximadamente 120 dias, o hidrogel atinge um nível de degradação, por hidrólise, em que a função de barreira celular deixa de ter efeito. Os produtos de degradação, consistem em PEG's solúveis em água excretáveis por via renal [44]. Segundo Herten *et al.* (2009), o tempo para ocorrer a biodegradação e perda do volume de estabilidade das membranas de PEG pode variar entre as 16 e as 24 semanas, segundo o estudo que efetuou em ratos [76].

## 2- Estudos em modelo animal: ratos Wistar

Grande parte da experimentação de novos produtos com vista à aplicação humana é feita previamente em animais. Em termos de experimentação de materiais dentários, nomeadamente implantes e produtos de regeneração óssea, são utilizados animais de pequeno porte, como os cães [56, 59, 77, 78, 89, 90, 98-102], porcos [31, 40, 91], macacos [6, 28] coelhos [39, 46, 75, 96, 103-107] e ratos [44, 76, 108-116]. Dependendo do objeto de estudo e, principalmente, tendo em conta o tamanho desse mesmo produto, são utilizados os animais mais adequados. É exemplo disso a utilização de cães para estudos com implantes [28, 46, 50], quando se quer obter uma simulação da cavidade oral em termos de cargas mastigatórias e/ou a ação de bactérias. Já em estudos de regeneração óssea ou tecidular guiadas, podem ser usados animais de menor dimensão, de forma a racionalizar o sacrifício de animais maiores. Consequentemente, é possível racionalizar os custos inerentes ao estudo, no seu todo, desde a compra, passando pela manutenção e posterior sacrifício e tratamento das peças para estudo dos animais. Nestes casos, a experimentação é feita em diferentes locais anatómicos, que não a cavidade

oral, por ser demasiado pequena para executar o trabalho de forma rigorosa ou mesmo para trabalhar. Exemplos de locais alternativos são a calote craniana do coelho [39, 75, 103], ou o dorso de ratos [44, 76]. Assim, grande parte dos estudos de membranas e substitutos ósseos são, atualmente, executados em coelhos, “mini-pigs”, porquinhos da Índia e ratos.

Através da pesquisa de estudos que envolvem ROG ou que testam a eficácia de membranas, foi possível concluir que era viável verificar a eficácia do hidrogel de PEG, como membrana, em ratos Wistar, os mais pequenos animais em que se pode trabalhar, fazendo uso da calote craniana.

## 2.1 - Definição de defeito crítico

Defeito crítico é a lesão óssea mais pequena que irá cicatrizar menos de 10% em termos de crescimento ósseo [117]. Também pode ser definido como o mais pequeno defeito de espessura total que não consegue regenerar por si só durante o período de vida de um animal sem intervenção [118]. O defeito crítico nos ossos parietais em ratos adultos da espécie Wistar é de 4mm de diâmetro, segundo Hollinger *et al.*, 1990 [119].

## 2.2- A importância de defeitos ósseos críticos para o estudo de materiais de regeneração óssea

Há um grande interesse no desenvolvimento de materiais de substituição óssea e de fatores humanos indutores de recombinação para aumentar a regeneração óssea, tanto no complexo craniofacial como noutras partes do esqueleto. Um problema persistente tem sido o de encontrar um modelo animal que permita a comparação de materiais osteoindutores diferentes. Um estudo realizado por Bosch *et al.* (1998) teve como objetivo determinar se um defeito de 5 mm em crânios de ratos adultos cumpria os requisitos de um defeito

ósseo de tamanho crítico e discutir a utilização deste modelo animal para avaliar a reparação óssea na região craniofacial. Foram criados defeitos bilaterais, através de uma trefina, de espessura total, no crânio de 56 ratos Wistar, com cinco a 6 meses de idade. Nenhum dos defeitos revelou quaisquer sinais de regeneração óssea espontânea entre e 12 meses após a cirurgia, a não ser a formação de pequenas quantidades de osso limitadas às margens do defeito. Os autores do estudo puderam concluir que a espessura total de 5 mm de defeitos de calvárias satisfazem os critérios para um defeito ósseo de tamanho crítico. Este modelo permite realizar uma experiência com um desenho emparelhado, evitando-se a inclusão da sutura sagital no defeito ósseo, e assim minimizar a morbilidade, reduzindo o risco de danificar o seio sagital mediano. Puderam ainda concluir que foi desenvolvido um modelo experimental adequado para avaliar a eficácia de materiais osteoindutores na cicatrização de defeitos ósseos na região craniomaxilofacial [120]. Outros estudos seguiram este modelo experimental para testar ou desenvolver os diversos materiais necessários à regeneração óssea [108-116, 121-125].

Assim, foram tomados como certos os 5 mm de diâmetro para a formação de um defeito crítico.

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos

### III - Materiais e métodos



## 1. Amostra

Foram utilizados sete ratos Wistar com 20 semanas de vida, com massas corporais entre as 318g e as 365g. Os animais foram alojados durante o período de ensaio em gaiolas isoladas, colocadas em armário devidamente programado em termos de temperatura, humidade, circulação de ar, pressão e ciclos de luz/escuridão para a espécie em estudo. Foi fornecida água e ração apropriada *ad libitum*.

## 2. Descrição dos procedimentos cirúrgicos

Cada rato funcionou como caso e como controlo. Para tal, foram criados dois defeitos ósseos críticos padronizados na calote craniana, de aproximadamente 5mm de diâmetro, através de uma régua standarizada (Fig.1) para o efeito, a qual permitiu manter a mesma distância das demais estruturas anatómicas.



**Figura 1 - Régua calibrada para os defeitos**

Iniciaram-se as cirurgias submetendo os animais a anestesia geral, tendo sido introduzidos numa câmara, na qual estiveram sujeitos a uma anestesia inalatória com isoflurano (IsoFlo<sup>®</sup>, veterinaria Esteve). Em seguida, foram anestesiados com uma injeção intra-peritoneal de uma preparação de 1:1 de 7.5mg/Kg de Ketamina (Imalgène<sup>®</sup> 1000, Merial) e de 5mg/Kg de Xizalina (Rompum<sup>®</sup>, Bayer HealthCare).

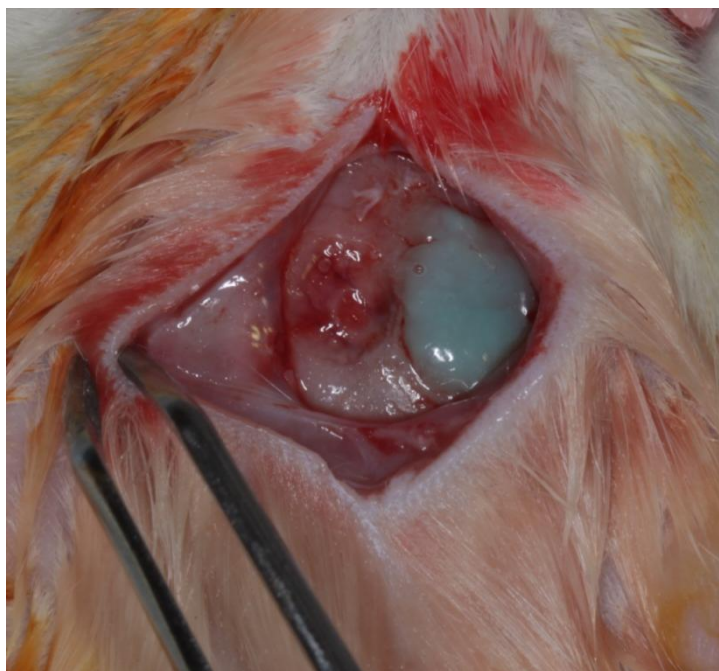
Após o registo do peso corporal dos animais, desinfectou-se a zona a intervencionar com uma solução iodada (Betadine<sup>®</sup>, solução cutânea 100mg/ml, MEDA Pharma).

Foi feita uma incisão sagital sobre a calote craniana a nível da sutura mediana, utilizando lâmina nº 15 montada em cabo de bisturi, estendendo-se desde a sutura coronal até à sutura parieto-occipital.

Após o descolamento total da pele e tecido celular subcutâneo, com descoladores e pinças de disseção, procedeu-se ao descolamento do perióstio, de modo a refletir o pericrânio da tábua óssea externa e aceder aos ossos parietais.

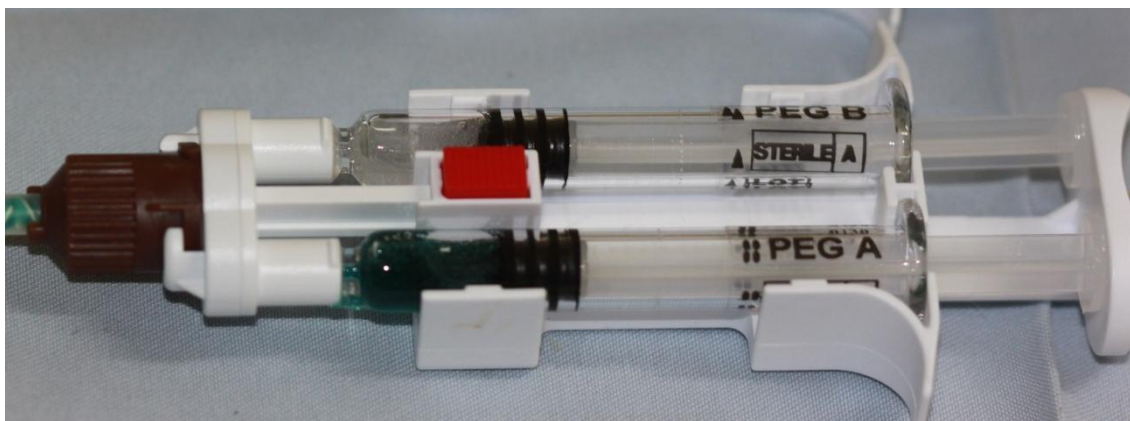
De seguida, produziram-se os defeitos ósseos circulares bilaterais nos ossos parietais, com cerca de 5mm de diâmetro e uma distância de 1,8mm entre ambos, não interferindo com nenhuma das suturas anteriormente referidas. Foi usada uma broca esférica montada em peça de mão a baixa rotação e irrigação com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%<sup>®</sup>, 250ml, Braun), não lesando a dura-máter nem atingindo o seio sagital.

No defeito criado do lado direito da calote foi colocada a membrana de hidrogel de polietileno glicol e do lado esquerdo não foi colocado qualquer material, funcionando este como defeito controlo (Fig.2).

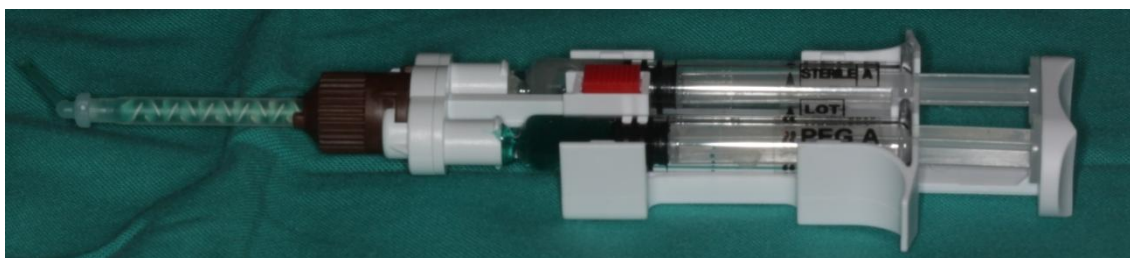


**Figura 2 - Membrana de PEG colocada no defeito à direita**

Para a preparação do hidrogel procedeu-se à ativação do produto através da junção do princípio ativo (PEG) com o respetivo ativador, A com A' e B com B', fazendo a mistura com 15 punções da misturadora. De seguida, removeu-se uma das partes, ficando o produto A e B num dos lados, na qual se encaixou a ponta auto-misturadora para finalização da formação do hidrogel e aplicação do mesmo (Fig.3 e 4).



**Figura 3 - Seringa do gel de PEG, ativada e utilizada**



**Figura 4 - Seringa com ponta auto-misturadora**

Na aplicação do hidrogel tentou-se que a camada do produto fosse tão fina quanto possível, e fez-se lenta e uniformemente. Verificou-se que, após pouco tempo, cerca de 90 segundos, o hidrogel, que inicialmente apresentava cor verde forte e a translucidez típica de um gel, passou a verde claro, ganhando opacidade e rigidez ao toque, sendo sinais de que a polimerização estava completa. Para que o hidrogel ficasse estável e para prevenir que as células não osteogénicas do tecido mole penetrassem no defeito, o produto foi aplicado pelo menos 2-3mm para além das margens do defeito.

Devido à boa adesão da membrana ao local de aplicação, não houve necessidade de outro tipo de fixação.

O encerramento da ferida operatória foi feito com a sutura dos tecidos com pontos simples, com fio de sutura reabsorvível de ácido poliglicólico

entrançado, revestido de 4/0 (Safil® 4/0, Braun), começando com a sutura do periósteo, seguida pela sutura da pele.

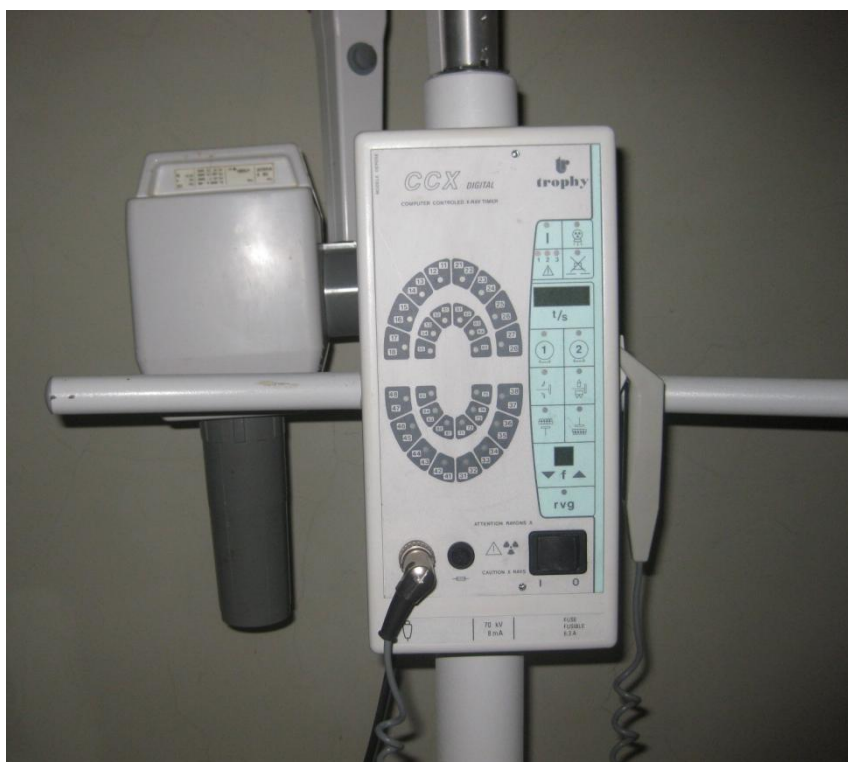
### 3. Preparação das amostras para estudo histológico

Após dois meses de espera, o tempo necessário para ocorrer regeneração óssea na espécie animal utilizada, procedeu-se ao sacrifício dos animais através da inalação de dióxido de carbono numa câmara fechada, seguida da aplicação em sobredosagem de preparação anestésica.

Fizeram-se radiografias do crânio (Fig.5) para observar a eventual existência de diferença de densidade óssea na zona dos defeitos ósseos com recurso a um aparelho de Raio X (Trophy Radiologie, CCX Digital 70kv, Vincennes, France) (Fig.6).



**Figura 5 - Radiografia da calote craniana**



**Figura 6 - Aparelho de Raio X**

Para a obtenção das peças para análise histológica, fez-se uma incisão linear sobre a calote craniana com as mesmas características e localização que a anteriormente descrita, dissecando cuidadosamente os tecidos moles e promovendo o acesso ao local dos defeitos ósseos.

Após o descolamento dos tecidos procedeu-se ao registo fotográfico da zona intervencionada. De seguida, para obtenção da peça operatória, procedeu-se à osteotomia da calote craniana através de um disco de tungsténio, aplicado numa peça de mão, refrigerado com soro fisiológico, verificando sempre que as margens da peça obtida ficavam a uma distância razoável da zona a estudar.

Após o destaque das amostras, os fragmentos foram divididos de modo a isolar o defeito usado para teste e o defeito usado para controlo, fazendo uma marcação dos mesmos na zona anterior para facilitar a orientação aquando dos cortes histológicos. Os fragmentos de osso foram colocados em frascos com formaldeído a 4% com tampão fosfato, pH=7,4, durante 48h, para fixação. De seguida, as amostras foram enviadas para processamento histológico de rotina



no Laboratório de Anatomia Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Para a preparação das amostras foi efetuada a desidratação em álcoois de concentração crescentes (álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 100%), permanecendo a amostra 48 horas em cada etapa (no caso da última solução, esta foi substituída três vezes, com períodos de permanência de 48 horas de cada vez). Seguiu-se a impregnação em metacrilato de metilo (Merck Schuchardt OHG - Merck KGaA, Hohenbrunn, Germany). Após a impregnação, as amostras foram incluídas no mesmo produto e, após polimerização, cortadas em micrótomoto (Accutom - Struers A/S, Ballerup, Denmark) (Fig.7) com disco de diamante. Foram feitos cortes de cerca de 150-200µm de espessura, a que se seguiu o polimento em polideira (Struers DAP-8, Struers A/S, Ballerup, Denmark) (Fig.8), até ser obtida uma espessura de cerca de 40µm. De seguida, as amostras foram coradas com Solocrom e montadas em lâminas de vidro, coladas com Permacol (Ind Permacol UV<sup>®</sup>, Adhesive 327/3, Permacol Ind., Holanda), polimerizado com luz ultravioleta. A colocação da lamela sobre a amostra seguiu o mesmo procedimento.



**Figura 7 - Micrótomoto**



Figura 8 - Polideira

#### 4. Análise Histomorfométrica

Os cortes foram observados em microscópio Leica DMLB<sup>®</sup> Type 020-519.010 LB30T (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heerbrugg, Germany) tendo estava acoplada uma câmara fotográfica digital Leica DFC295 (Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Germany), com objectiva Leica 506083 com aumento de 2,5x. Para a análise quantitativa, foram fotografadas as imagens observadas nos cortes e efetuadas medições das áreas dos defeitos e da regeneração, recorrendo ao procedimento “cego”, por parte do operador, através de uma caneta e mesa digitais[40] (Wamboo Pen & Touch, Wacom Company, Ltd), utilizando o programa Leica Application Suite, Version 3.5.0 (Leica Microsystems, Ltd, Switzerland) (Fig.9).



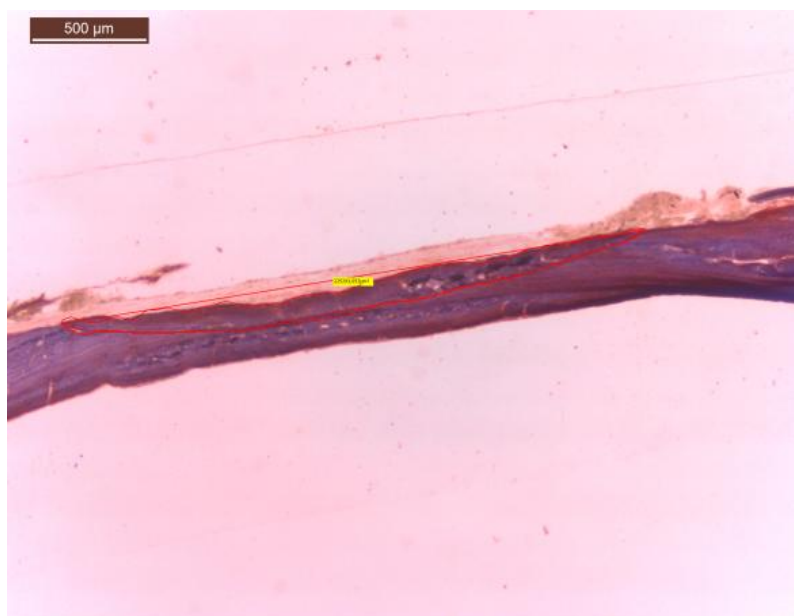
Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos



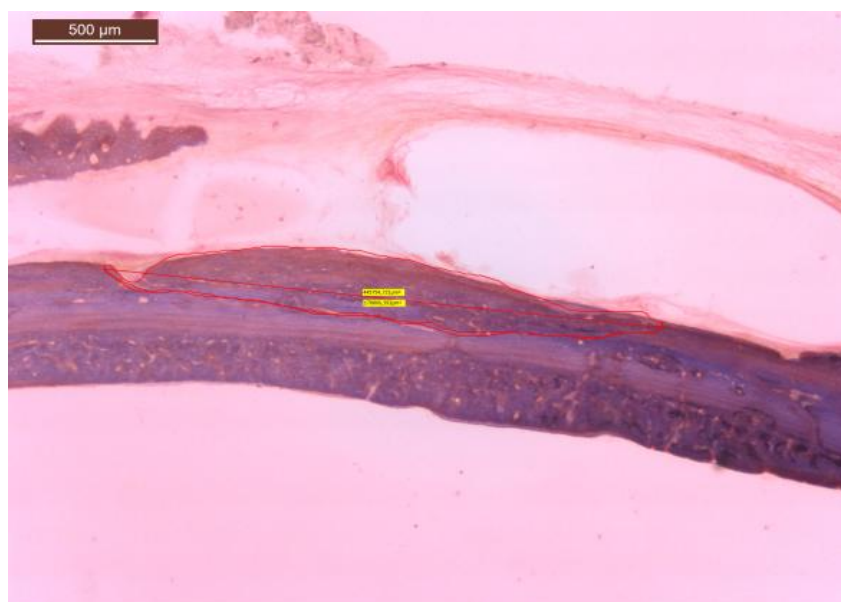
**Figura 9 - Microscópio acoplado ao computador e respetiva mesa de medição**

Foram medidos os seguintes parâmetros: área total do defeito e área total de osso regenerado. Os resultados foram apresentados em percentagem da área total do defeito.

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos



**Figura 10- Fotomicrografia com exemplo de medição de área regenerada sem membrana  
(ampliação de 1,25x)**



**Figura 11 - Fotomicrografia com exemplo de medição de área regenerada com membrana  
(ampliação 1,25x)**

## 5. Análise estatística

O trabalho efetuado é um estudo piloto, num modelo animal, com ratos Wistar. O tamanho da amostra foi escolhido por conveniência.

Os resultados foram analisados através do programa estatístico SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL). Realizou-se um teste de Shapiro-Wilks, mais preciso para amostras pequenas ( $n < 30$ ), de modo a testar a normalidade da distribuição. Como a amostra era pequena e não apresentava uma distribuição normal, optou-se por testes não paramétricos, realizando-se o teste de Mann Withney U, que compara a diferença entre as medianas de dois grupos independentes.

Foram consideradas as seguintes hipótese:

$H_0$  – não existe diferença entre a utilização de membrana ou a sua ausência;

$H_1$  – existe diferença entre a utilização de membrana ou a sua ausência.

## IV - Resultados

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

Os animais mostraram-se saudáveis durante todo o período do estudo. Todos tiveram um aumento do peso e não foram registradas quaisquer infecções pós-operatórias ou problemas de cicatrização. No momento do sacrifício, não foram detetados quaisquer sinais de inflamação local.

1.1. Análise clínica

Após o descolamento dos tecidos verificou-se, macroscopicamente, a persistência da membrana do hidrogel de polietileno glicol, na maior parte dos casos.



**Figura 12 - Fotografia de uma calote após descolamento dos tecidos. É perceptível a presença da membrana de PEG**

### 1.2. Análise radiográfica

Através de uma radiografia com feixe perpendicular à calote craniana não se conseguiu obter qualquer diferença entre ambos os grupos. Quer nos defeitos preenchidos com membrana, quer nos defeitos controlo, não se visualizou qualquer diferença.



**Figura 13 - Fotografia do procedimento para obtenção de radiografia à calote**

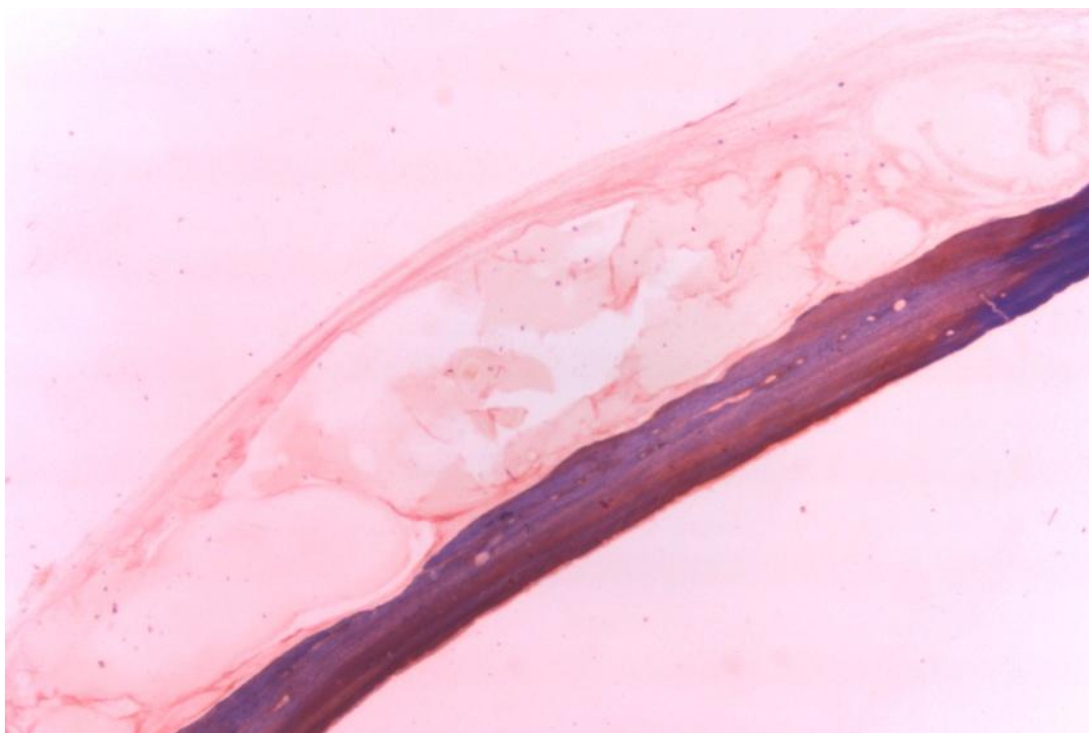


**Figura 14 - Radiografia da calote**

### 1.3. Histologia Descritiva (análise morfológica)

O hidrogel de PEG manteve a sua forma durante os 60 dias de regeneração. A membrana tinha, na maior parte dos casos, uma forma semi-lunar e, em termos gerais, estava intacta (Fig. 15). Na relação com o tecido mole, o hidrogel apresentava uma superfície globalmente lisa, com poucas irregularidades.

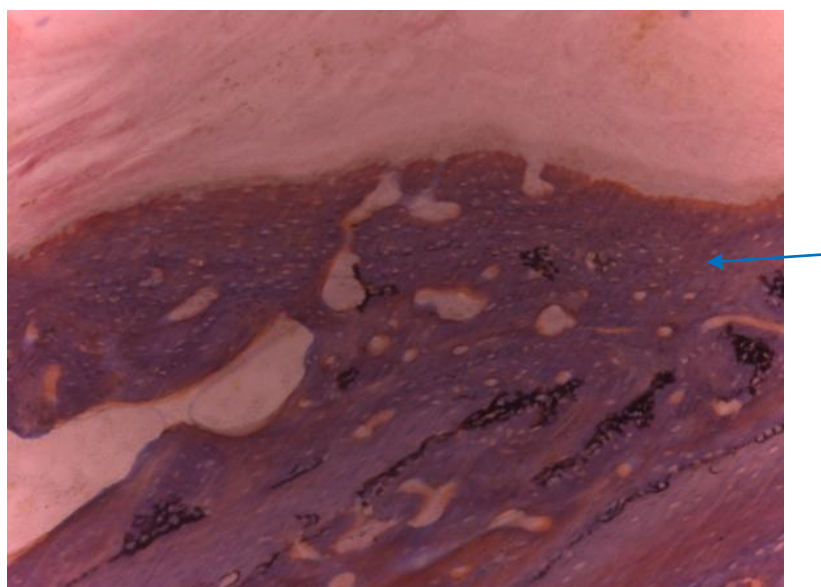
Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos



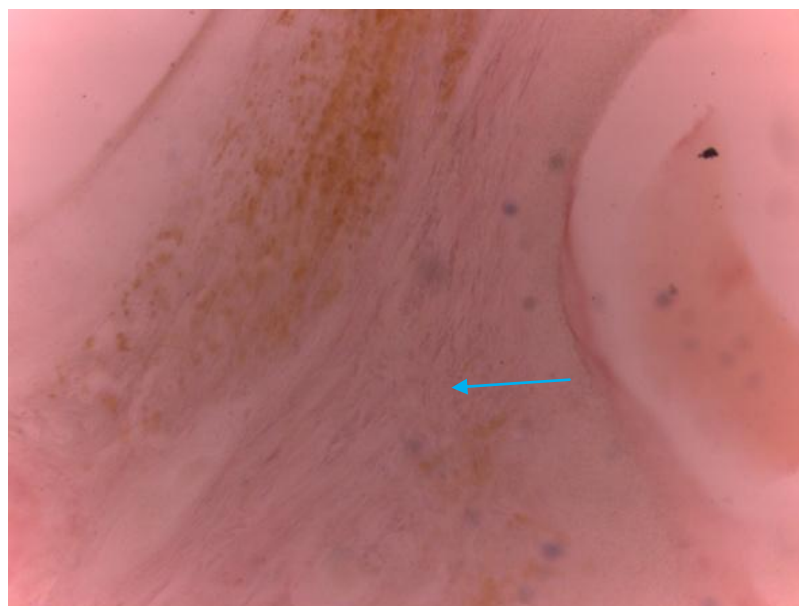
**Figura 15 - Membrana de PEG (ampliação 25x)**

O hidrogel estava rodeado por um grande número de fibroblastos e algumas células inflamatórias. Por entre estas camadas de células e das células adiposas do tecido celular subcutâneo foram observados feixes de fibras de colagénio tendencialmente paralelos à superfície do hidrogel, com alguma irregularidade na sua disposição (Fig. 16 e 17).

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos



**Figura 16 - Fotomicrografia das áreas do defeito (→ indica local de neoformação óssea) (ampliação 100x, coloração com Solocrom)**



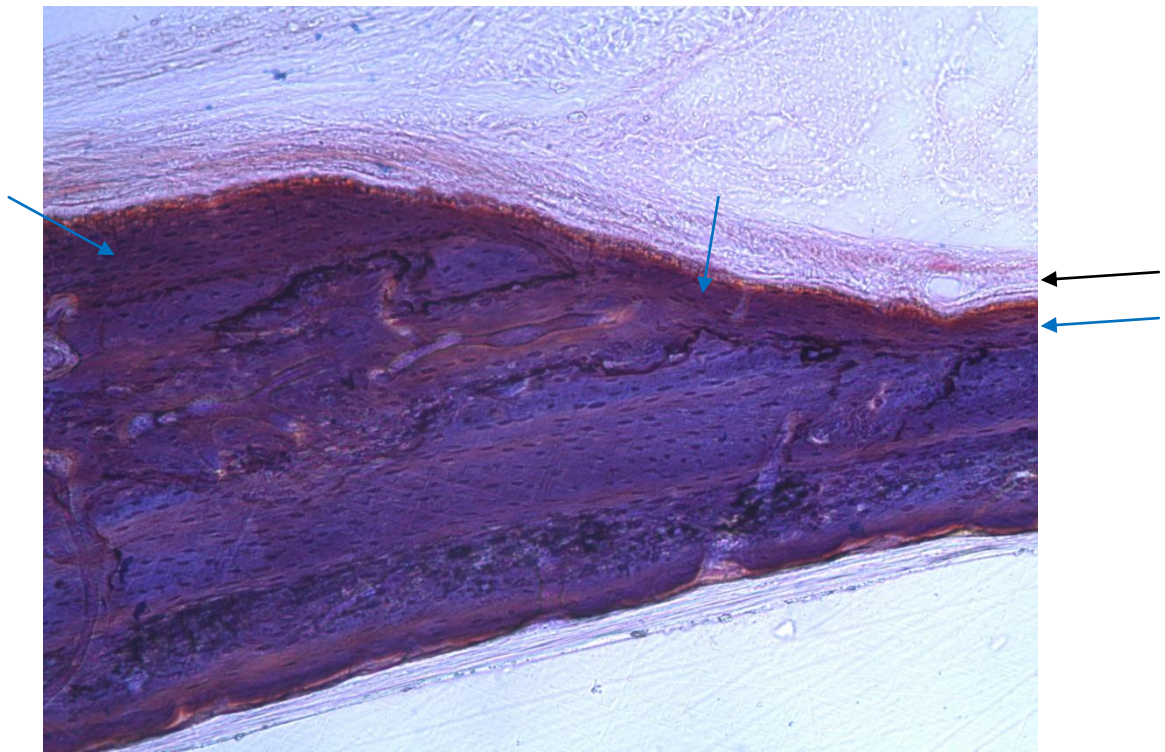
**Figura 17 - Fotomicrografia das áreas do defeito (→ indica fibras de colagénio) (ampliação 100x, coloração com Solocrom)**

Na parte interna, o hidrogel de PEG estava praticamente em contacto direto com o novo osso formado e o tecido conjuntivo contendo fibroblastos, vasos sanguíneos e algumas células inflamatórias. A neoformação óssea foi apenas



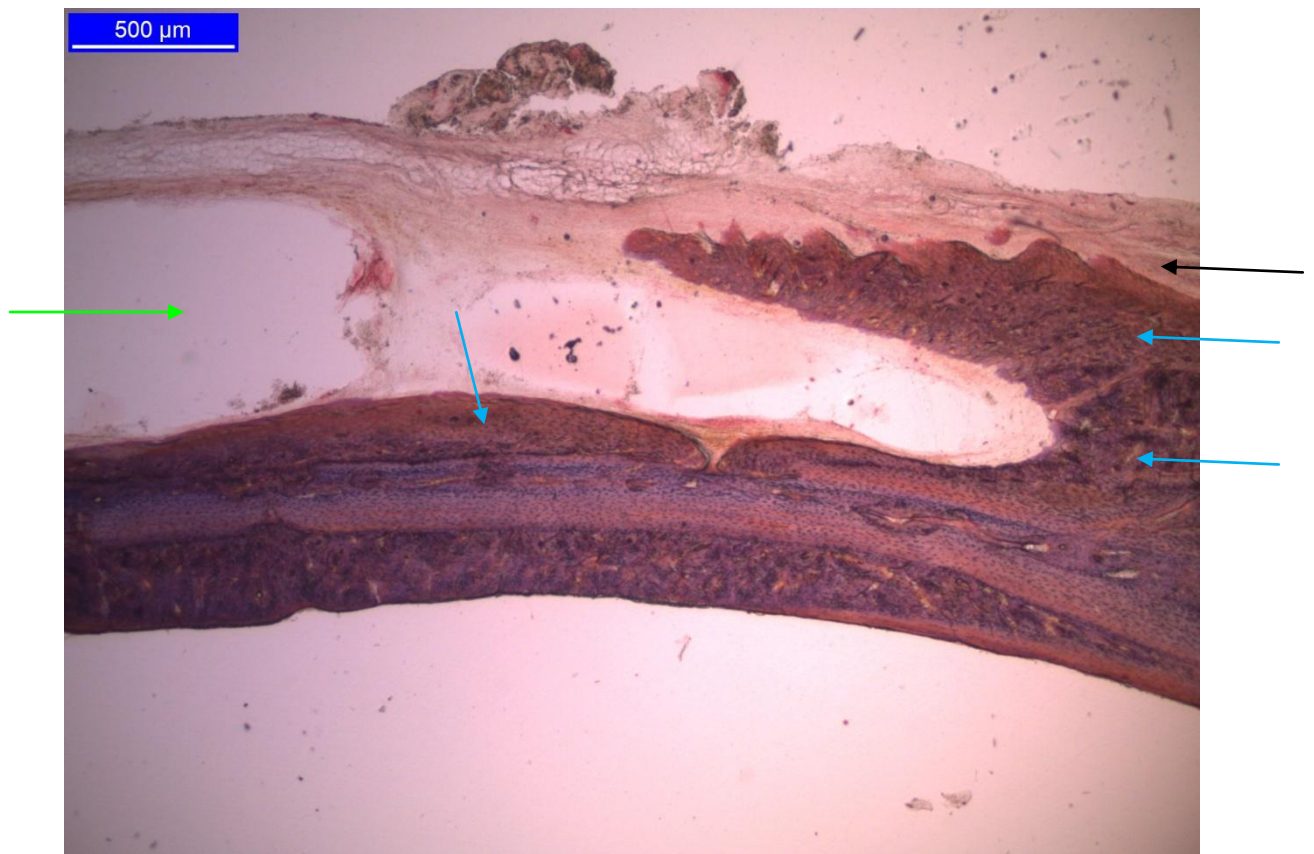
Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos

limitada pela membrana de PEG e a calote craniana. Foi possível verificar a presença de osteoblastos na zona de neoformação óssea. (Fig. 18)



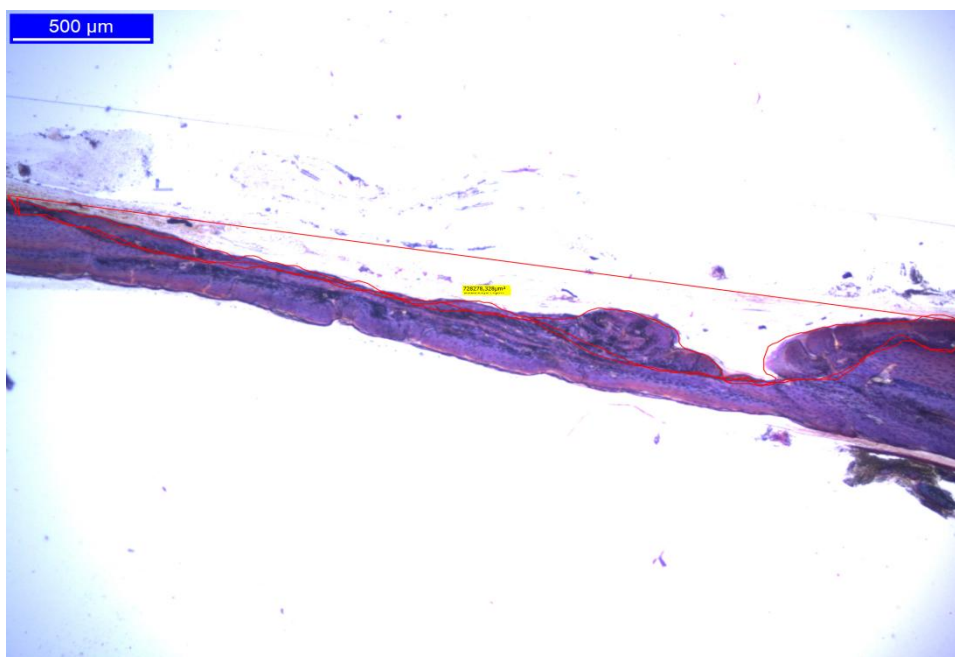
**Figura 18 - Fotomicrografia da área do defeito ósseo (ampliação 100x, coloração com Solocrom)**  
(→ indica matriz essencialmente colagénica; → indica local de neoformação óssea)

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos



**Figura 19 - Fotomicrografia do defeito ósseo (ampliação 50x) (→ indica membrana de PEG; → indicam locais de neoformação óssea; → indica matriz óssea essencialmente colagénica)**

Comparativamente com o controlo podemos verificar que nos defeitos preenchidos com o hidrogel de PEG, houve maior crescimento ósseo (Fig. 19), apesar do inexistente efeito de tenda, promovido por algumas membranas pré-fabricadas.



**Figura 20 - Fotomicrografia da medição da área de um corte de um defeito ósseo de controlo (ampliação 25x)**

Observou-se que, em todos os defeitos teste, a membrana de PEG funcionou como barreira, prevenindo a infiltração celular.

Nos defeitos sem membrana, verificou-se praticamente a ausência de regeneração óssea, mantendo-se o defeito idêntico ao inicial, com preenchimento do mesmo com tecido conjuntivo, fibroblastos e células inflamatórias.

#### 1.4. Análise da invasão celular

Através da observação dos cortes histológicos, pode-se verificar que não ocorreu qualquer invasão tecidular oriunda dos tecidos moles. Nos defeitos preenchidos com membrana, esta continuou presente, com bordos bem definidos, tendo-se verificado que ocorreu crescimento ósseo. Nos defeitos sem membrana, praticamente não ocorreu crescimento ósseo, sendo este, quando presente, residual.

### 1.5. Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica está resumida na tabela I

Defeitos	Cortes	área inicial ( $\mu\text{m}^2$ )	área Regenerada ( $\mu\text{m}^2$ )	Membrana (com/sem)	% de regeneração
1	76-12 1 <sup>o</sup> -1	447971,333	417164,51	Com	93%
1	76-12 1 <sup>o</sup> -2	573016,768	293573,574	Com	51%
2	76-12 2 <sup>o</sup> -1	675584,948	618681,452	Com	92%
2	76-12 2 <sup>o</sup> -2	445754,721	178866,393	Com	40%
3	77-12 2 <sup>o</sup> -1	273936,335	225293,053	Sem	82%
3	77-12 2 <sup>o</sup> -2	659878,225	227509,609	Sem	34%
4	78-12 1 <sup>o</sup> -2	1465167,024	1141063,624	Com	78%
4	78-12 1 <sup>o</sup> -3	880369,143	555222,443	Com	63%
5	78-12 2 <sup>o</sup> -1	517810,404	218175,811	Com	42%
5	78-12 2 <sup>o</sup> -2	119449,929	77205,419	Com	65%
5	78-12 2 <sup>o</sup> -3	418601,842	272412,414	Com	65%
6	78-12 3 <sup>o</sup> -2	926039,455	839697,344	Com	91%
7	79-12 1 <sup>o</sup> -1	767456,888	694843,466	Sem	91%
7	79-12 1 <sup>o</sup> -2	427644,085	319214,987	Sem	75%
8	79-12 2 <sup>o</sup> -1	637227,778	242177,074	Sem	38%
8	79-12 2 <sup>o</sup> -2	375983,354	119640,358	Sem	32%
9	79-12 3 <sup>o</sup> -1	1086919,145	865034,714	Sem	80%
9	79-12 3 <sup>o</sup> -2	1005736,843	462342,449	Sem	46%
10	80-12 1 <sup>o</sup> -2	540038,936	349221,777	Com	65%
11	80-12 2 <sup>o</sup> -1	724569,491	147452,262	Com	20%
11	80-12 2 <sup>o</sup> -2	910138,96	337757,323	Com	37%
11	80-12 2 <sup>o</sup> -3	640372,003	405621,104	Com	63%
12	81-12 1 <sup>o</sup> -1	454973,227	185820,213	Sem	41%
13	81-12 2 <sup>o</sup> -2	728278,328	262560,849	Sem	36%
13	81-12 2 <sup>o</sup> -3	390516,446	145914,001	Sem	37%

Tabela 1 - Áreas dos defeitos antes e depois da regeneração

## 1.6. Análise estatística

### Estatística descritiva

	com/sem membrana	Statistic	Std. Error
% de regeneração (em sistema decimal)	sem membrana	Mean	,5382
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	,3842
		Upper Bound	,6922
		5% Trimmed Mean	,5296
		Median	,4100
		Variance	,053
		Std. Deviation	,22925
		Minimum	,32
		Maximum	,91
		Range	,59
		Interquartile Range	,44
		Skewness	,671
		Kurtosis	-1,599
	com membrana	Mean	,6179
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	,4899
		Upper Bound	,7458
		5% Trimmed Mean	,6237
		Median	,6400
		Variance	,049
		Std. Deviation	,22154
		Minimum	,20
		Maximum	,93
		Range	,73
		Interquartile Range	,40
		Skewness	-,167
		Kurtosis	-,590

Tabela 2 - Estatística descritiva

A análise estatística descritiva dos dados, mostrou que na ausência de membrana a revestir o defeito ósseo, a mediana para a percentagem de

regeneração é de 41% com um desvio padrão de 22,93%. Nos defeitos revestidos com membrana, a mediana é de 64% com um desvio padrão de 22,2%.

Os seguintes histogramas ilustram a distribuição das frequências de regeneração com e sem membrana.

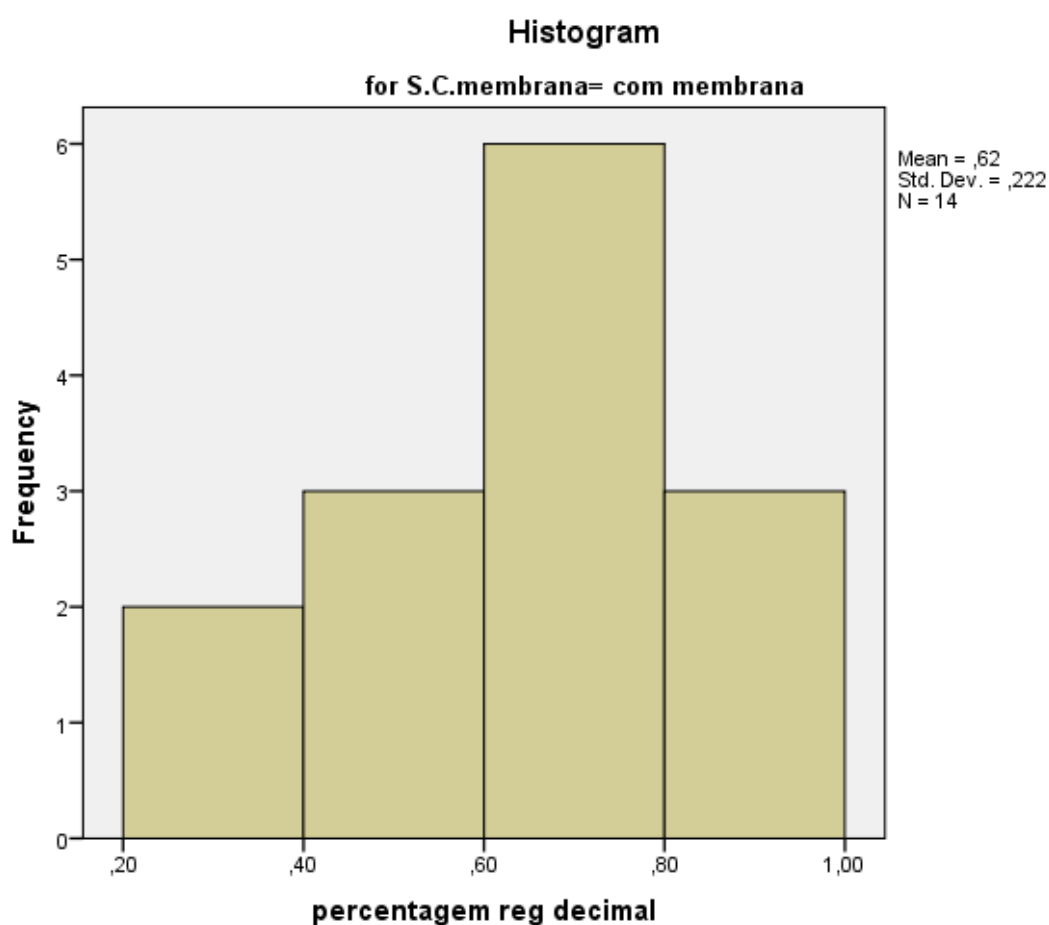


Gráfico 1- Histograma de frequência de regeneração com membrana

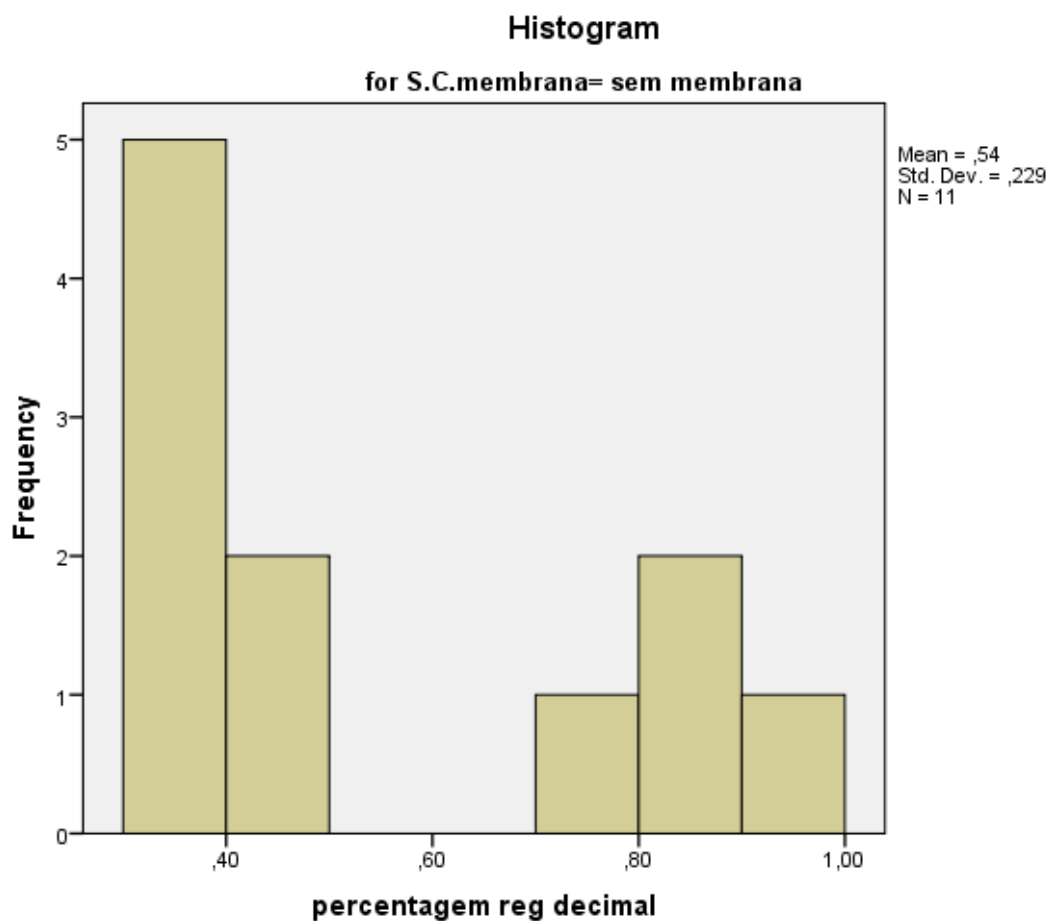
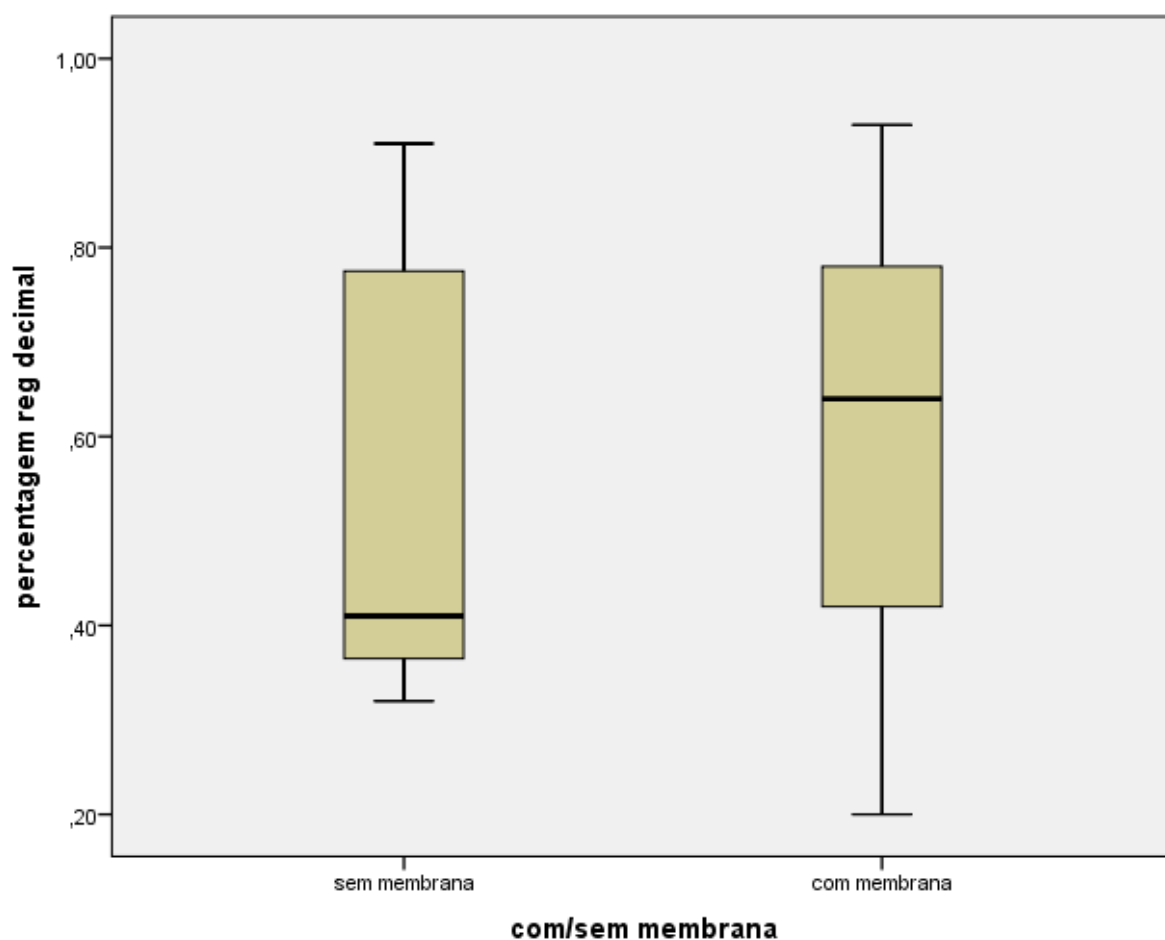


Gráfico 2 - Histograma de frequência de regeneração sem membrana

Pela análise dos gráficos, verifica-se que há mais defeitos com maior regeneração na presença de membrana, invertendo-se esta tendência nos defeitos em que não foi usada membrana, havendo mais defeitos com menor regeneração.



**Gráfico 3 - Gráfico de caixas e bigodes**

No gráfico 3 é possível observar que há uma tendência numa maior regeneração óssea nos defeitos ósseos com membrana. A distribuição é mais simétrica no grupo com membrana, sendo evidente um maior nível de regeneração.

De modo a verificar que a amostra tinha uma distribuição normal fez-se um teste de Shapiro-Wilk.



**Tests of Normality**

	com/sem membrana	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
percentagem reg decimal	<b>sem membrana</b>	,270	11	,024	,801	11	<b>,010</b>
	com membrana	,165	14	,200	,942	14	,447

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

**Tabela 3 - Teste de Shapiro-Wilks**

Como, no grupo sem membrana, o valor de  $p$  é menor que 0,05, considera-se que os grupos não apresentam uma distribuição normal. Estes dados são confirmados pelos gráficos Q-Q plots:

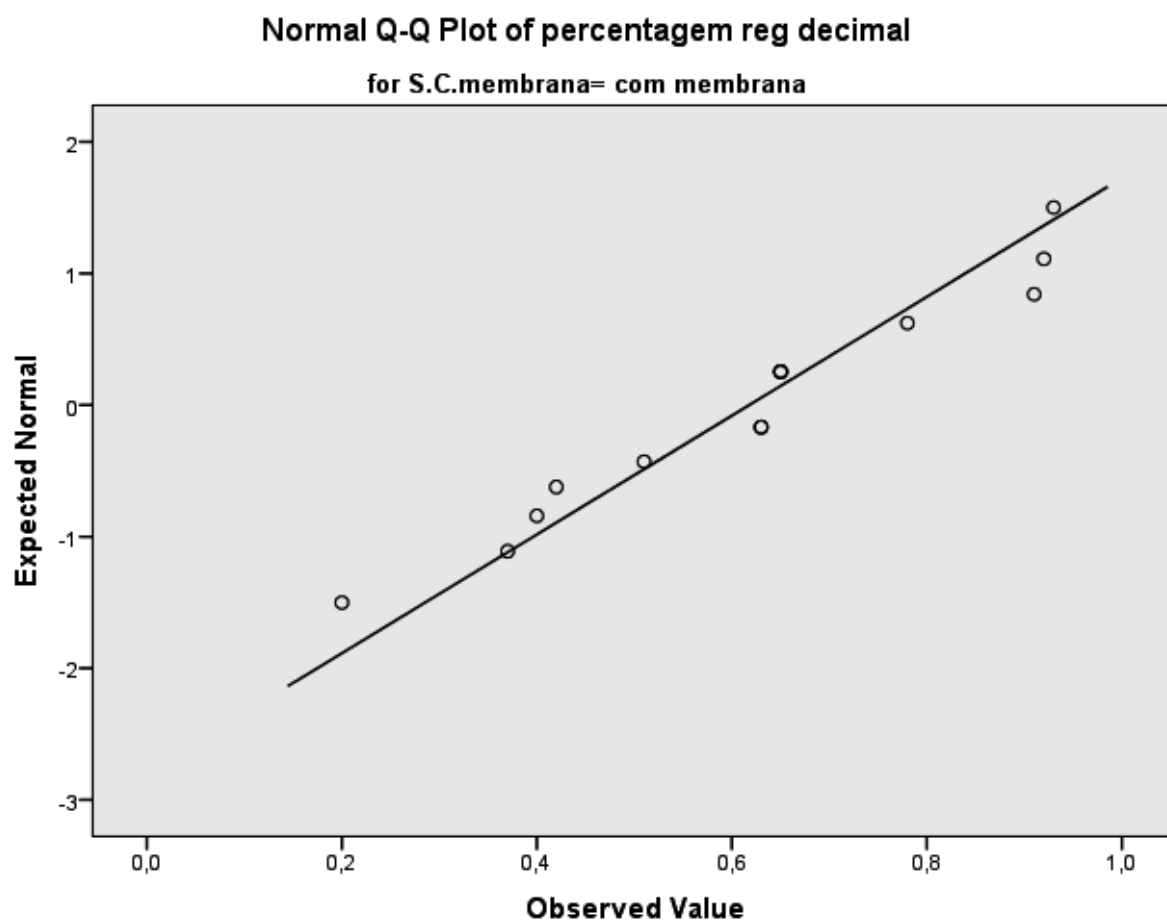


Gráfico 4 - Q-Q plot com membrana

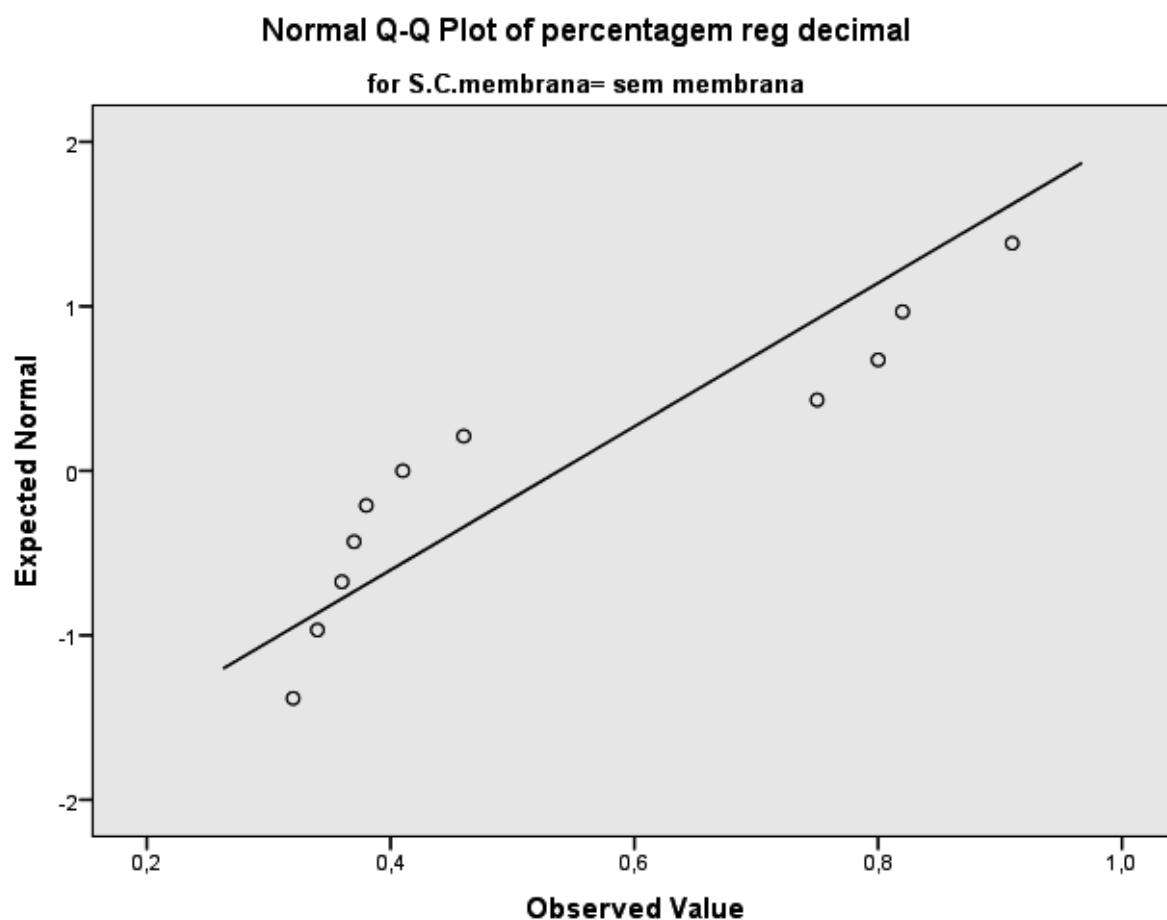


Gráfico 5 - Q-Q plot sem membrana

Desta forma, optou-se por testes não paramétricos, fazendo um teste de Mann-Whitney:

Ranks				
	com/sem membrana	N	Mean Rank	Sum of Ranks
percentagem reg decimal	sem membrana	11	11,18	123,00
	com membrana	14	14,43	202,00
	Total	25		

Tabela 4 - Teste de Mann-Whitney

A tabela 4 indica qual o grupo que teve a maior regeneração óssea, ou seja, o grupo com o mais alto valor médio. Pode-se assim constatar que o grupo com membrana teve maior regeneração óssea.

Test Statistics <sup>a</sup>	
	percentagem reg decimal
Mann-Whitney U	57,000
Wilcoxon W	123,000
Z	-1,096
Asymp. Sig. (2-tailed)	,273
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,291 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: com/sem membrana

b. Not corrected for ties.

**Tabela 5 – 2ª tabela do teste de Mann-Whitney**

Pela análise do teste de Mann-Whitney, como  $p > 0,05$ , verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mas há uma tendência em haver maior regeneração óssea nos defeitos com membrana, como ilustra o gráfico de caixas e bigodes (Gráfico 3).

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

## V - Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que os hidrogéis de PEG funcionam como barreira tecidual, podendo ser utilizados como membrana.

A membrana de PEG manteve a forma original durante os 60 dias de regeneração.

Tendo em conta o segundo objetivo do estudo, os defeitos preenchidos com a membrana de PEG, obtiveram maior regeneração óssea, não tendo os resultados obtidos evidenciado diferenças estatisticamente significativas.

É de salientar que, em alguns dos cortes histológicos dos defeitos preenchidos com membrana se obtiveram piores resultados que noutros em que a membrana não foi aplicada, o que se poderá dever ao facto de não terem sido criadas as condições para ocorrer a esperada regeneração por terem sido criados defeitos ósseos críticos (5mm) e a membrana, por si só, não fazer o efeito tenda, chegando mesmo a preencher o defeito.

O hidrogel de PEG, usado como membrana, é formado por moléculas com múltiplos braços de PEG. Tem mais braços, mas são mais pequenos do que os utilizados em sistemas de matrizes para a libertação de moléculas bioativas, investigados com sucesso em estudos pré-clínicos [95, 96, 126]. A diferença entre o PEG utilizado como matriz e o PEG presentemente utilizado como membrana assenta na sua estrutura química. Ficou demonstrado que os géis de PEG, consistindo em moléculas multi-braços, são considerados barreiras celulares, devido ao facto de que as distâncias entre os pontos de ligação cruzada serem significativamente mais pequenas do que o tamanho de uma célula[44]. A função de barreira foi examinada num estudo, após colocação subcutânea de géis de PEG em ratos. As análises histológicas revelaram prevenção da penetração celular no grupo com membrana até aos 4 meses [44]. Num estudo efetuado por Jung *et al.* (2006), a membrana de PEG foi utilizada com sucesso no tratamento de defeitos não críticos na calote de coelhos. Após quatro semanas de cicatrização, as análises histomorfométricas e as tomografias computadorizadas efetuadas demonstraram quantidades idênticas de novo osso formado para defeitos tratados com as membranas de PEG comparativamente com os defeitos tratados com uma membrana *standard* de PTFE-e. A membrana de PTFE-e e as membranas de PEG revelaram

valores com diferenças estatisticamente significativas comparativamente com os resultados obtidos em defeitos tratados sem qualquer membrana [39].

Além da utilização do PEG em matrizes e em membranas, o PEG é atualmente utilizado noutras áreas médicas. A segurança e a efetividade de um material aplicado por um sistema de aerossol para ser usado como barreira em cirurgia laparoscópica tem sido estudado em ensaios clínicos prospetivos randomizados controlados [82]. Ficou demonstrado que o material de PEG é seguro, bem tolerado e que não provoca reações adversas atribuídas ao material, não havendo doentes aos quais não possa ser aplicado. Estas descobertas estão de acordo com os resultados do trabalho efetuado por Jung *et al.* (2009), no qual foram estudados vários parâmetros de reação dos tecidos moles ao PEG. Neste estudo foi feita a comparação entre uma membrana de PEG para ROG com uma membrana de colagénio e testada a aplicação desta membrana formada *in situ*, no sentido de verificar se resultaria em idêntica quantidade de regeneração óssea, comparativamente com uma membrana de colagénio. As análises histológicas semi-quantitativas e clínicas efetuadas não revelaram qualquer reação biológica anormal relativamente à membrana em estudo. No estudo de Jung *et al.*, seis meses após a cirurgia regenerativa, as membranas de colagénio estavam infiltradas por fibroblastos e macrófagos, enquanto que a membrana de PEG apenas permitiu a passagem de macrófagos. Isto demonstra que a membrana de PEG é uma barreira celular eficaz por um tempo prolongado e que também é eficaz durante o período de degradação. Em contraponto, a membrana de PEG, pode ter uma menor integração dos tecidos moles. A avaliação clínica da cobertura dos tecidos moles revelou um total de 9% de deiscências em 44 locais após 28 dias. No entanto, todas as deiscências de tecidos moles foram encontradas em 22 locais tratados com PEG, demonstrando uma taxa de exposição da membrana de 18% [59]. Esta taxa assemelha-se à de outros estudos efetuados também em cães, mostrando uma incidência de exposição de membranas não reabsorvíveis e reabsorvíveis, respectivamente de 20% para 60% [21, 101, 127].

A utilização de ratos Wistar no presente estudo enquadra-se na experiência obtida com o seu uso noutros trabalhos de avaliação da eficácia de membranas para regeneração óssea ou para o estudo da regeneração óssea de forma isolada [76, 110, 116, 123]. O defeito crítico na calote craniana de ratos Wistar é um modelo experimental seletivo para a regeneração óssea [110, 112, 114, 115, 119-122]. Os defeitos utilizados no presente estudo provaram ser críticos tal como ficou demonstrado pela reduzida ou inexistente regeneração óssea nos defeitos sem membrana, neste e noutros estudos [108-116, 120-125]. Outra razão da opção deste modelo animal foi a sua fácil obtenção para amostra homogénea e a sua fácil manipulação.

O número de animais utilizados neste trabalho foi reduzido, por se tratar de um estudo preliminar. Contudo os resultados poderão levar à realização de outros trabalhos experimentais, por forma a consolidar as indicações recolhidas sobre possíveis vantagens resultantes da utilização do hidrogel de PEG como barreira celular na ROG, em detrimento de outras membranas.

Os resultados obtidos vão ao encontro dos obtidos em anteriores estudos pré-clínicos, que demonstraram a capacidade da membrana de PEG para manter espaço de modo a prevenir a invasão celular em defeitos angulares e de funcionar como barreira quando acompanhada de material de preenchimento ósseo [40, 44]. Outros estudos pré-clínicos demonstraram o potencial da membrana de PEG como membrana para ROG em combinação com ou sem colocação imediata de implantes [39, 59]. Num estudo clínico controlado randomizado [74], a membrana de PEG foi usada em combinação com osso bovino mineral desproteínizado e o seu efeito comparado com uma membrana de colagénio de origem porcina em combinação com o referido osso em defeitos de deiscência à volta de implantes. O preenchimento vertical do defeito foi de 94,9% no defeito teste preenchido com PEG e de 96,4% nos defeitos usados como controlo.

Neste estudo, verificou-se que o espaço do defeito a regenerar foi ocupado por quantidades significativas de PEG, tal como referido em estudos anteriores [75, 91]. O que se deve à natureza fluida do hidrogel na fase inicial, aquando da



aplicação sobre todo o defeito, fazendo com que a membrana preenchesse o defeito. Resultados semelhantes obteve Aaboe et al.[128] num estudo em calotes cranianas de coelhos, tendo concluído que as membranas reabsorvíveis não têm rigidez e colapsam para dentro dos defeitos sem suporte, resultando em pequenas quantidades de novo osso confinado aos bordos.

Relativamente à biocompatibilidade, Jung *et al.* (2009), tinham já demonstrado esta capacidade do hidrogel de PEG em aplicações na ROG[74]. Previamente, Jung *et al.* (2007) relataram a ausência de reações inflamatórias dos tecidos moles e duros durante regenerações tecidulares intra e extra orais com hidrogéis de PEG [96]. De igual forma, havia sido já provado que membranas de hidrogel PEG formado *in situ* eram capazes de manter o espaço necessário para regeneração óssea, mas havendo para tal um substituto ósseo para ocupar o defeito [39, 74].

Uma das maiores vantagens da utilização da membrana de PEG é o manuseamento clínico e a possibilidade de aplicação da membrana diretamente no local cirúrgico. Além disto, não há perda de tempo com cortes e adaptação da forma da membrana, tal como ocorre aquando da utilização de membranas *standartizadas* [59]. Em estudos efetuados em humanos e animais, foi testada uma membrana composta por ácido poliláctico dissolvido em *N*-metil-pirrolidona, como barreira em regenerações de perda de tecidos periodontais [129, 130]. Apesar deste material poder precipitar *in situ* da solução através da adição de água[131], na maioria dos estudos, uma membrana feita deste polímero foi formada extra-oralmente antes da sua aplicação ao defeito periodontal [130, 132].

A viscosidade da membrana de PEG torna este gel indicado para as aplicações clínicas a que se propõe, sem escorrer material para as zonas adjacentes. Além disso, a utilização deste hidrogel de PEG, como membrana, irá representar uma evolução para procedimentos futuros de ROG [59].

Em termos estatísticos, verifica-se, no presente trabalho, que não há uma distribuição normal dos grupos ( $p < 0,05$ ), como se pode verificar, pelo teste de

Shapiro-Wilks, e confirmar de forma ilustrada pelos Q-Q plots. Nestes gráficos e, nomeadamente no gráfico referente aos defeitos sem membrana, constata-se que os quantis (pontos no gráfico) não estão muito próximo do eixo, fazendo mesmo quase uma parábola, ou seja, confirma-se que a amostra não segue uma distribuição normal.

Através do teste de Mann-Whitney, verificou-se que não se rejeita a hipótese nula de que a regeneração óssea é igual com ou sem membrana. Assim, podemos afirmar que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, a regeneração observada nos defeitos tratados com membrana apresenta melhores resultados do que nos defeitos sem membrana. Pode-se também inferir que estamos perante um erro tipo dois, tendo como causa provável a reduzida dimensão da amostra.

Apesar de não ser um dos objetivos do trabalho, deve-se salientar que, com o material usado o acoplamento dos dois componentes com respetivos ativadores na seringa que os transporta, deve ser executado com atenção. Com alguma facilidade se cometem erros na junção dos mesmos, no procedimento de encaixe e com extravasamento de parte do produto, mas também com mistura errada dos componentes e ativadores. Quando isto ocorre, pode perder-se grande parte de pelo menos um dos componentes, o que leva ao desperdício de todo o kit por serem afetadas as proporções corretas a acautelar na mistura.

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos

## VI - Conclusões

O presente estudo demonstrou que os hidrogéis de PEG funcionam como membrana sintética formada *in situ*, podendo ser utilizados como barreira celular reabsorvível. Verificou-se que o hidrogel de PEG é seguro, demonstrando que não há reação tecidual significativa, comparativamente com o defeito sem qualquer preenchimento. Podem ser utilizados como barreira celular, funcionando como membrana na ROG, em tratamentos de defeitos críticos em calotes cranianas de ratos Wistar.

A densidade do hidrogel demonstrou a capacidade de manutenção da forma e resistência à degradação, nos 60 dias que durou o estudo.

Após o período de cicatrização, as análises histomorfométricas demonstraram que houve mais regeneração óssea nos defeitos cobertos com a membrana de hidrogel, do que nos defeitos sem membrana, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa. Esta membrana de PEG formada *in situ* tem o potencial de ir ao encontro dos requisitos para os procedimentos da ROG. No entanto, apesar das propriedades como barreira celular, é necessário cuidado na ROG em defeitos sem suporte.

O modelo experimental de defeito crítico em calote craniana de ratos Wistar adapta-se aos estudos de ROG com membranas de PEG.

Tendo em conta que se trata de um estudo exploratório, pode-se apenas concluir que o hidrogel de PEG pode ser utilizado como membrana na ROG, necessitando, porém, de um material de substituição óssea para manutenção do espaço dos defeitos a regenerar.

Este estudo piloto permitiu também concluir que o hidrogel de PEG, na apresentação de seringas de auto-mistura, se torna num instrumento de fácil utilização, auxiliando a aplicação clínica de uma membrana reabsorvível, sem necessidade de adaptação prévia. Quanto à apresentação do produto em si,

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:

estudo caso controlo em ratos

deve ser melhorado o sistema de encaixe, para evitar perda de produto quando se procede à sua ativação.

São necessários mais estudos, nomeadamente de índole clínica, para avaliar os hidrogéis de PEG experimentais em ROG.

## Bibliografia

1. Macewen, W., *The Role of the Various Elements in the Development and Regeneration of Bone*. Br Med J, 1907. **1**(2425).
2. Brooks, B., *Studies in Regeneration and Growth of Bone: The Demonstration of New Formed Bone by Intravital Staining*. Ann Surg, 1917. **65**(6): p. 704-10.
3. Dodds-Parker, A.P., *Two Cases of Bone-regeneration after Osteomyelitis*. Proc R Soc Med, 1922. **15**(Sect Study Dis Child): p. 58.
4. May, H., *The Regeneration of Bone Transplants*. Ann Surg, 1937. **106**(3): p. 441-53.
5. Buser, D., *20 Anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia*. 2ª Edição ed. 2010: Quintessence.
6. Gottlow, J., et al., *New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(8): p. 494-503.
7. Gottlow, J., et al., *New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(6): p. 604-16.
8. Nyman, S., et al., *Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1990. **5**(1): p. 9-14.
9. Wachtel, H.C., et al., *[Guided bone tissue regeneration--a clinical and histological pilot study]*. Dtsch Zahnarztl Z, 1990. **45**(8): p. 458-61.
10. Buser, D., et al., *Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration*. Clin Oral Implants Res, 1990. **1**(1): p. 22-32.
11. Lazzara, R.J., *Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1989. **9**(5): p. 332-43.
12. Jovanovic, S.A., H. Spiekermann, and E.J. Richter, *Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1992. **7**(2): p. 233-45.
13. Dahlin, C., L. Andersson, and A. Linde, *Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study*. Clin Oral Implants Res, 1991. **2**(4): p. 159-65.
14. Becker, W. and B.E. Becker, *Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques and case report*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1990. **10**(5): p. 376-91.
15. Lindhe, *Clinical Periodontology and Implant Dentistry 5th*. 2008.
16. Friedenstein, A.J., *Determined and Inducible Osteogenic Precursor Cells*, in *Ciba Foundation Symposium 11 - Hard Tissue Growth, Repair and Remineralization*. 2008, John Wiley & Sons, Ltd. p. 169-185.
17. Dahlin, C., et al., *Healing of bone defects by guided tissue regeneration*. Plast Reconstr Surg, 1988. **81**(5): p. 672-6.
18. Kostopoulos, L. and T. Karring, *Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer*. Clin Oral Implants Res, 1994. **5**(2): p. 66-74.
19. Buser, D., et al., *Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1993. **13**(1): p. 29-45.
20. Buser, D., et al., *Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1995. **15**(1): p. 10-29.

21. Buser, D., et al., *Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1995. **10**(6): p. 666-81.
22. Buser, D., et al., *Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients*. J Oral Maxillofac Surg, 1996. **54**(4): p. 420-32.
23. Buser, D., et al., *Long-term stability of osseointegrated implants in bone regenerated with the membrane technique. 5-year results of a prospective study with 12 implants*. Clin Oral Implants Res, 1996. **7**(2): p. 175-83.
24. Jovanovic, S.A., *The management of peri-implant breakdown around functioning osseointegrated dental implants*. J Periodontol, 1993. **64**(11 Suppl): p. 1176-83.
25. Becker, W., et al., *The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1994. **9**(1): p. 31-40.
26. Rosenquist, B. and B. Grenthe, *Immediate placement of implants into extraction sockets: implant survival*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1996. **11**(2): p. 205-9.
27. Nyman, S.R. and N.P. Lang, *Guided tissue regeneration and dental implants*. Periodontology 2000, 1994. **4**: p. 109-18.
28. Dahlin, C., et al., *Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys*. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1990. **24**(1): p. 13-9.
29. Dahlin, C., et al., *Histological morphology of the e-PTFE/tissue interface in humans subjected to guided bone regeneration in conjunction with oral implant treatment*. Clin Oral Implants Res, 1998. **9**(2): p. 100-6.
30. Donos, N., et al., *Bone formation by enamel matrix proteins and xenografts: an experimental study in the rat ramus*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(2): p. 140-6.
31. Zambon, R., et al., *The effect of loading in regenerated bone in dehiscence defects following a combined approach of bone grafting and GBR*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(5): p. 591-601.
32. Hammerle, C.H. and R.E. Jung, *Bone augmentation by means of barrier membranes*. Periodontol 2000, 2003. **33**: p. 36-53.
33. Hammerle, C.H., R.E. Jung, and A. Feloutzis, *A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients*. J Clin Periodontol, 2002. **3**: p. 226-31.
34. Fiorellini, J.P. and M.L. Nevins, *Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review*. Ann Periodontol, 2003. **8**(1): p. 321-7.
35. Chiapasco, M., M. Zaniboni, and M. Boisco, *Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants*. Clin Oral Implants Res, 2006. **2**: p. 136-59.
36. Aghaloo, T.L. and P.K. Moy, *Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement?* Int J Oral Maxillofac Implants, 2007. **22**: p. 49-70.
37. Bunyaratavej, P. and H.L. Wang, *Collagen membranes: a review*. J Periodontol, 2001. **72**(2): p. 215-29.
38. Dahlin, C., U. Lekholm, and A. Linde, *Membrane-induced bone augmentation at titanium implants. A report on ten fixtures followed from 1 to 3 years after loading*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1991. **11**(4): p. 273-81.
39. Jung, R.E., et al., *Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(4): p. 426-33.

40. Thoma, D.S., et al., *Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(1): p. 7-16.
41. Schlegel, A.K., K. Donath, and S. Weida, *Histological findings in guided bone regeneration (GBR) around titanium dental implants with autogenous bone chips using a new resorbable membrane*. J Long Term Eff Med Implants, 1998. **8**(3-4): p. 211-24.
42. Schlegel, K.A., et al., *The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **102**(1): p. 7-13.
43. Schlegel, K.A., et al., *Expression of bone matrix proteins during the osseous healing of topical conditioned implants: an experimental study*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(6): p. 666-72.
44. Wechsler, S., et al., *A novel, tissue occlusive poly(ethylene glycol) hydrogel material*. J Biomed Mater Res A, 2008. **85**(2): p. 285-92.
45. Simion, M., et al., *A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1994. **14**(2): p. 166-80.
46. Aaboe, M., et al., *Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes*. Clin Oral Implants Res, 1998. **9**(5): p. 313-20.
47. Mayfield, L., et al., *Guided bone regeneration in dental implant treatment using a bioabsorbable membrane*. Clin Oral Implants Res, 1997. **8**(1): p. 10-7.
48. Zitzmann, N.U., R. Naef, and P. Scharer, *Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1997. **12**(6): p. 844-52.
49. Greenstein, G. and J.G. Caton, *Biodegradable barriers and guided tissue regeneration*. Periodontology 2000, 1993. **1**: p. 36-45.
50. Hammerle, C.H., et al., *Successful bone formation at immediate transmucosal implants: a clinical report*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1998. **13**(4): p. 522-30.
51. Jung, R.E., et al., *Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(5): p. 556-68.
52. Moses, O., et al., *Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(2): p. 210-9.
53. Zitzmann, N.U., P. Scharer, and C.P. Marinello, *Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2001. **16**(3): p. 355-66.
54. Hammerle, C.H. and N.P. Lang, *Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials*. Clin Oral Implants Res, 2001. **12**(1): p. 9-18.
55. Strietzel, F.P., et al., *Healing pattern of bone defects covered by different membrane types--a histologic study in the porcine mandible*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006. **78**(1): p. 35-46.
56. Hockers, T., et al., *The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs*. Clin Oral Implants Res, 1999. **10**(6): p. 487-98.
57. Brunel, G., et al., *Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases*. J Periodontol, 2001. **72**(2): p. 257-64.
58. Pirhonen, E.M., T.H. Pohjonen, and F.E. Weber, *Novel membrane for guided bone regeneration*. Int J Artif Organs, 2006. **29**(9): p. 834-40.



59. Jung, R.E., et al., *A feasibility study evaluating an in situ formed synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration in dogs*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(2): p. 151-61.
60. Postlethwaite, A.E., J.M. Seyer, and A.H. Kang, *Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(2): p. 871-5.
61. Schwarz, F., et al., *Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(4): p. 403-9.
62. Rothamel, D., et al., *Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(3): p. 369-78.
63. Sela, M.N., et al., *Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(3): p. 263-8.
64. Rothamel, D., et al., *Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells*. Clin Oral Implants Res, 2004. **15**(4): p. 443-9.
65. Schwarz, F., et al., *Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(4): p. 481-8.
66. Donos, N., L. Kostopoulos, and T. Karring, *Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts. An experimental study in the rat*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(2): p. 203-13.
67. Donos, N., L. Kostopoulos, and T. Karring, *Augmentation of the rat jaw with autogeneic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(2): p. 192-202.
68. Dahlin, C., et al., *Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1989. **4**(1): p. 19-25.
69. Nevins, M. and J.T. Mellonig, *Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the GORE-TEX membrane*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1992. **12**(2): p. 96-111.
70. Donos, N., L. Kostopoulos, and T. Karring, *Augmentation of the mandible with GTR and onlay cortical bone grafting. An experimental study in the rat*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(2): p. 175-84.
71. Simion, M., P. Trisi, and A. Piattelli, *Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1994. **14**(6): p. 496-511.
72. Nowzari, H. and J. Slots, *Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1995. **10**(1): p. 67-73.
73. Hammerle, C.H. and T. Karring, *Guided bone regeneration at oral implant sites*. Periodontology 2000, 1998. **17**: p. 151-75.
74. Jung, R.E., et al., *A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(2): p. 162-8.
75. Humber, C.C., et al., *Bone healing with an in situ-formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010. **109**(3): p. 372-84.

76. Herten, M., et al., *Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: an immunohistochemical study in rats*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(2): p. 116-25.
77. Polson, A.M., et al., *Periodontal healing after guided tissue regeneration with Atrisorb barriers in beagle dogs*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1995. **15**(6): p. 574-89.
78. Coonts, B.A., et al., *Biodegradation and biocompatibility of a guided tissue regeneration barrier membrane formed from a liquid polymer material*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(2): p. 303-11.
79. Hou, L.T., et al., *Polymer-assisted regeneration therapy with Atrisorb barriers in human periodontal intrabony defects*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(1): p. 68-74.
80. Rosen, P.S. and M.A. Reynolds, *Guided bone regeneration for dehiscence and fenestration defects on implants using an absorbable polymer barrier*. J Periodontol, 2001. **72**(2): p. 250-6.
81. Lutolf, M.P. and J.A. Hubbell, *Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition*. Biomacromolecules, 2003. **4**(3): p. 713-22.
82. Mettler, L., et al., *Prospective clinical trial of SprayGel as a barrier to adhesion formation: an interim analysis*. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 2003. **10**(3): p. 339-44.
83. Johns, D.A., R. Ferland, and R. Dunn, *Initial feasibility study of a sprayable hydrogel adhesion barrier system in patients undergoing laparoscopic ovarian surgery*. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 2003. **10**(3): p. 334-8.
84. Boogaarts, J.D., et al., *Use of a novel absorbable hydrogel for augmentation of dural repair: results of a preliminary clinical study*. Neurosurgery, 2005. **57**(1 Suppl): p. 146-51.
85. Wallace, D.G., et al., *A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(5): p. 545-55.
86. Schoenmakers, R.G., et al., *The effect of the linker on the hydrolysis rate of drug-linked ester bonds*. J Control Release, 2004. **95**(2): p. 291-300.
87. van de Wetering, P., et al., *Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by conjugate addition with controllable swelling, degradation, and release of pharmaceutically active proteins*. J Control Release, 2005. **102**(3): p. 619-27.
88. Elbert, D.L., et al., *Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions*. J Control Release, 2001. **76**(1-2): p. 11-25.
89. Schwarz, F., et al., *Influence of two barrier membranes on staged guided bone regeneration and osseointegration of titanium implants in dogs: part 1. Augmentation using bone graft substitutes and autogenous bone*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(1): p. 83-9.
90. Mihatovic, I., et al., *Influence of two barrier membranes on staged guided bone regeneration and osseointegration of titanium implants in dogs. Part 2: augmentation using bone graft substitutes*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(3): p. 308-15.
91. Wehrhan, F., et al., *PEG matrix enables cell-mediated local BMP-2 gene delivery and increased bone formation in a porcine critical size defect model of craniofacial bone regeneration*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(7): p. 805-13.
92. Ramel, C.F., et al., *A randomized, controlled clinical evaluation of a synthetic gel membrane for guided bone regeneration around dental implants: clinical and radiologic 1- and 3-year results*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012. **27**(2): p. 435-41.
93. Ruoslahti, E., *RGD and other recognition sequences for integrins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 697-715.
94. Muller, U., et al., *Integrin alpha 8 beta 1 promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(4): p. 433-48.

95. Jung, R.E., et al., *The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(3): p. 319-25.
96. Jung, R.E., et al., *Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2007. **22**(2): p. 258-66.
97. Roberts, M.J., M.D. Bentley, and J.M. Harris, *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(4): p. 459-76.
98. Mihatovic, I., et al., *Influence of two barrier membranes on staged guided bone regeneration and osseointegration of titanium implants in dogs. Part 2: augmentation using bone graft substitutes*. Clinical Oral Implants Research, 2012. **23**(3): p. 308-315.
99. Aukhil, I., E. Pettersson, and C. Suggs, *Guided tissue regeneration. An experimental procedure in beagle dogs*. J Periodontol, 1986. **57**(12): p. 727-34.
100. Casati, M.Z., et al., *Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs*. J Periodontol, 2002. **73**(7): p. 789-96.
101. Oh, T.J., et al., *Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(1): p. 80-90.
102. Stavropoulos, A. and U.M. Wikesjo, *Influence of defect dimensions on periodontal wound healing/regeneration in intrabony defects following implantation of a bovine bone biomaterial and provisions for guided tissue regeneration: an experimental study in the dog*. J Clin Periodontol, 2010. **37**(6): p. 534-43.
103. Thoma, D.S., et al., *Biodegradation, soft and hard tissue integration of various polyethylene glycol hydrogels: a histomorphometric study in rabbits*. Clinical Oral Implants Research, 2011. **22**(11): p. 1247-1254.
104. Hammerle, C.H., et al., *Osseous healing of experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. A pilot study*. Clin Oral Implants Res, 1992. **3**(3): p. 144-7.
105. Hammerle, C.H., et al., *Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration*. J Oral Maxillofac Surg, 1995. **53**(2): p. 167-74.
106. Van Steenberghe, D., et al., *Bone augmentation by means of a stiff occlusive titanium barrier*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(1): p. 63-71.
107. Aslan, M., G. Simsek, and E. Dayi, *Guided bone regeneration (GBR) on healing bone defects: a histological study in rabbits*. J Contemp Dent Pract, 2004. **5**(2): p. 114-23.
108. Blom, E.J., et al., *Transforming growth factor-beta1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects*. Clin Oral Implants Res, 2001. **12**(6): p. 609-16.
109. Cacciafesta, V., et al., *Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects*. Eur J Orthod, 2001. **23**(6): p. 733-40.
110. Verna, C., et al., *Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(9): p. 865-70.
111. Mardas, N., A. Stavropoulos, and T. Karring, *Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen): an experimental study in rats*. Clin Oral Implants Res, 2008. **19**(10): p. 1010-5.
112. Schwarz, F., et al., *Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(11): p. 1219-30.

113. Donos, N., et al., *The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical-size calvarial defects*. Clin Oral Implants Res, 2011. **22**(12): p. 1346-53.
114. Donos, N., et al., *In vivo gene expression profile of guided bone regeneration associated with a microrough titanium surface*. Clin Oral Implants Res, 2011. **22**(4): p. 390-8.
115. Ivanovski, S., et al., *Transcriptional profiling of "guided bone regeneration" in a critical-size calvarial defect*. Clin Oral Implants Res, 2011. **22**(4): p. 382-9.
116. de Brito Bezerra, B., et al., *Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(8): p. 938-42.
117. Mulliken, J.B. and J. Glowacki, *Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region*. Plast Reconstr Surg, 1980. **65**(5): p. 553-60.
118. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986. **205**: p. 299-308.
119. Hollinger, J.O. and J.C. Kleinschmidt, *The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials*. J Craniofac Surg, 1990. **1**(1): p. 60-8.
120. Bosch, C., B. Melsen, and K. Vargervik, *Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials*. J Craniofac Surg, 1998. **9**(4): p. 310-6.
121. Luvizuto, E.R., et al., *The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects*. Biomaterials, 2011. **32**(15): p. 3855-61.
122. Toker, H., et al., *Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model*. Arch Oral Biol, 2012. **57**(11): p. 1545-50.
123. Notodihardjo, F.Z., et al., *Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats*. J Craniomaxillofac Surg, 2012. **40**(3): p. 287-91.
124. Nyan, M., et al., *Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010. **93**(1): p. 65-73.
125. Issa, J.P., et al., *Collagen fibers evaluation after rhBMP-2 insertion in critical-sized defects*. Micron, 2009. **40**(5-6): p. 560-2.
126. Lutolf, M.P., et al., *Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 513-8.
127. von Arx, T., et al., *Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2001. **16**(3): p. 343-54.
128. Aaboe, M., E.M. Pinholt, and E. Hjorting-Hansen, *Healing of experimentally created defects: a review*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1995. **33**(5): p. 312-8.
129. Bogle, G., et al., *Periodontal regeneration in naturally occurring Class II furcation defects in beagle dogs after guided tissue regeneration with bioabsorbable barriers*. J Periodontol, 1997. **68**(6): p. 536-44.
130. Garrett, S., et al., *Comparison of a bioabsorbable GTR barrier to a non-absorbable barrier in treating human class II furcation defects. A multi-center parallel design randomized single-blind trial*. J Periodontol, 1997. **68**(7): p. 667-75.
131. Rosen, P.S. and M.A. Reynolds, *Polymer-assisted regenerative therapy: case reports of 22 consecutively treated periodontal defects with a novel combined surgical approach*. J Periodontol, 1999. **70**(5): p. 554-61.
132. Jepsen, S., et al., *Evaluation of a new bioabsorbable barrier for recession therapy: a feasibility study*. J Periodontol, 2000. **71**(9): p. 1433-40.

## Índice de Figuras, Tabelas e Gráficos

Figura 1 - Régua calibrada para os defeitos.....	58
Figura 2 - Membrana de PEG colocada no defeito à direita .....	59
Figura 3 - Seringa do gel de PEG, ativada e utilizada .....	60
Figura 4 - Seringa com ponta auto-misturadora.....	60
Figura 5 - Radiografia da calote craniana .....	61
Figura 6 - Aparelho de Raio X.....	62
Figura 7 - Micrótomo.....	63
Figura 8 - Polideira.....	64
Figura 9 - Microscópio acoplado ao computador e respetiva mesa de medição .....	65
Figura 10- Fotomicrografia com exemplo de medição de área regenerada sem membrana (ampliação de 1,25x) .....	66
Figura 11 - Fotomicrografia com exemplo de medição de área regenerada com membrana (ampliação 1,25x) .....	66
Figura 12 - Fotografia de uma calote após descolamento dos tecidos. É perceptível a presença da membrana de PEG .....	69
Figura 13 - Fotografia do procedimento para obtenção de radiografia à calote .....	69
Figura 14 - Radiografia da calote .....	70
Figura 15 - Membrana de PEG.....	71
Figura 16 - Fotomicrografia das áreas do defeito (→ indica local de neoformação óssea).....	72
Figura 17 - Fotomicrografia das áreas do defeito (→ indica fibras de colagénio).....	72
Figura 18 - Fotomicrografia da área do defeito ósseo (ampliação 5x) (→ indica matriz essencialmente colagénica; → indica local de neoformação óssea) .....	73
Figura 19 - Fotomicrografia do defeito ósseo (2,5x) (→ indica membrana de PEG; → indicam locais de neoformação óssea; → indica matriz óssea essencialmente colagénica).....	74
Figura 20 - Fotomicrografia da medição da área de um corte de um defeito ósseo de controlo .....	75
Gráfico 1- Histograma de frequência de regeneração com membrana .....	78
Gráfico 2 - Histograma de frequência de regeneração sem membrana .....	79
Gráfico 3 - Gráfico de caixas e bigodes .....	80
Gráfico 4 - Q-Q plot com membrana .....	82
Gráfico 5 - Q-Q plot sem membrana .....	83
Tabela 1 - Áreas dos defeitos antes e depois da regeneração .....	76

Tabela 2 - Estatística descritiva .....	77
Tabela 3 - Teste de Shapiro-Wilks .....	81
Tabela 4 - Teste de Mann-Whitney .....	83
Tabela 5 – 2ª tabela do teste de Mann-Whitney .....	84

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controle em ratos

Membrana reabsorvível de hidrogel de polietileno glicol na regeneração óssea guiada:  
estudo caso controlo em ratos

Anexos



## Tabelas

Cirurgia		Sacrifício	
RATO	PESO inicial (g)	SEXO	PESO final (g)
II	350	F	540
IV	365	F	500
VI	325	F	410
XIII	345	F	470
X	320	F	470
XII	360	M	500
XIV	318	M	518

Tabela com os pesos no dia da 1ª cirurgia e no dia do sacrifício dos ratos